

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 4 月 15 日 (15.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/030683 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 35/78, 31/353,
A61P 19/08, 19/10, 43/00, A23K 1/16, A23L 1/30, G01N
33/50, 33/15 // C07D 311/80

(KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒529-1851 滋賀県 甲賀郡
信楽町長野 1 4 5 4 番地 1 5 Shiga (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012382

(74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-6591
大阪府 大阪市 中央区 大手前一丁目 7 番 3 1 号 OMM
ビル 5 階 私書箱 2 6 号 細田国際特許事務所内 Osaka
(JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 9 月 29 日 (29.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-289056 2002 年 10 月 1 日 (01.10.2002) JP
特願2002-354414 2002 年 12 月 5 日 (05.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカ
ラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒
520-2193 滋賀県 大津市 瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga
(JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大野木 宏
(OHNOGI, Hiromu) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県 草津
市 西渋川二丁目 1 2-1-3 1 1 Shiga (JP). 杉山 勝
美 (SUGIYAMA, Katsumi) [JP/JP]; 〒520-2134 滋賀
県 大津市 瀬田三丁目 8-8-2 1 0 Shiga (JP). 村
木 信子 (MURAKI, Nobuko) [JP/JP]; 〒529-1851 滋
賀県 甲賀郡 信楽町長野 5 2 0 Shiga (JP). 佐川 裕
章 (SAGAWA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県 草
津市 西渋川二丁目 6-3 2 Shiga (JP). 加藤 郁之進

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDIES

(54) 発明の名称: 治療剤

(57) Abstract: A remedy or a preventive for diseases with a need for the promotion of osteogenesis or the potentiation of the production of an osteogenic protein, an osteogenesis promoter or an osteogenic protein production potentiator, and foods, drinks or feeds for promoting osteogenesis or potentiating the production of an osteogenic protein, each characterized by containing a processed material originating in a plant as the active ingredient. A method of measuring the effect of potentiating the production of an osteogenic protein, a method of screening a substance having an effect of potentiating the production of an osteogenic protein, and a process for producing a substance having an effect of potentiating the production of an osteogenic protein, each using specific cells.

(57) 要約: 本発明は、植物由来処理物を有効成分として含有することを特徴とする、骨形成促進または骨形成タンパク質産生増強を要する疾患の治療剤又は予防剤、骨形成促進剤または骨形成タンパク質産生増強剤、並びに骨形成促進用または骨形成タンパク質産生増強用の食品、飲料又は飼料に関する。また、本発明は、特定の細胞を用いる、骨形成タンパク質産生増強作用の測定方法、骨形成タンパク質産生増強作用を有する物質のスクリーニング方法、並びに骨形成タンパク質産生増強作用を有する物質の製造方法に関する。

明 細 書

治療剤

技術分野

本発明は、骨形成促進または骨形成タンパク質産生増強を要する疾患、例えば骨粗鬆症や骨折等の治療または予防に有用な医薬、食品、飲料又は飼料に関する。

背景技術

骨組織では、常に骨形成と骨吸収が一定のバランスを保ちながら繰り返されており、この営みが骨強度や血中のカルシウム濃度を調節している。骨形成には骨芽細胞が、骨吸収には破骨細胞が中心的な役割を担っており、骨形成と骨吸収のバランスが何らかの要因で崩れた時に、骨粗鬆症が引き起こされると考えられている。骨粗鬆症はエストロゲンの分泌低下を要因とする閉経後骨粗鬆症と、加齢を要因とする老人性骨粗鬆症に大別されるが、これら以外にも糖尿病や甲状腺機能亢進症などの内分泌・代謝疾患やステロイドなどの薬剤投与、消化器・肝疾患、ビタミンC欠乏、不動性、卵巣摘出、関節リウマチなどを要因とする続発性骨粗鬆症も知られている。

現在のところ、骨粗鬆症の治療薬としては、エストロゲン剤、カルシトニン、ビスホスホネート等の主として骨吸収を阻害することによって骨の量的減少を抑える薬剤が用いられている。しかしながら、エストロゲン剤治療では乳がんや子宮がん、心疾患のリスクが上昇するなど副作用が強く、カルシトニンでは薬剤の耐性が生じ易く、経口投与が不可能であり、ビスホスホネートは吸収率が悪い、残留性が高く骨代謝の過度の不活性化を招くといった欠点がある。また、骨代謝を活性化させる目的でビタミンD₃製剤が使用されているが、他の薬剤に比べて

治療効果が低い割に、高カルシウム症などの副作用が大きい。これら従来の骨粗鬆症の治療薬は、既に進行した骨の欠失を元どおりに回復させることはできず、真の骨粗鬆症の治療剤として十分なものとは言い難い。

骨形成と密接に関係する細胞は骨芽細胞である。骨芽細胞は、軟骨細胞、筋肉細胞、脂肪細胞、腱細胞などと共通の間葉系幹細胞を起源としており、分化の過程で前骨芽細胞を経て成熟骨芽細胞になる。骨芽細胞は成熟過程において骨の構成成分であるコラーゲンをはじめとする大量の細胞外マトリクスを生産し、またアルカリ性フォスファターゼを発現しリン酸カルシウムのマトリクスへの沈着を引き起こす。一部の骨芽細胞はこうして石灰化したマトリクスの中に埋め込まれ、さらに骨細胞へと分化する。

ヒトの骨量は20～30才に最大を示し以降は減少してゆく。加齢とともに骨組織中の骨芽細胞数は減少し、また間葉系幹細胞からの骨芽細胞への分化能も低下する。反面、同じ間葉系幹細胞を由来とする脂肪細胞数が加齢とともに増殖するとも言われている。従って骨の成長期に骨芽細胞、骨細胞量を高めておくことや、老年期や閉経後において間葉系幹細胞からの骨芽細胞への分化をより選択的に促進させて、骨形成を高めることは、骨粗鬆症の予防、治療からしても有効であると考えられる。

最近になり、骨の形成を促進する薬剤についての開発が行われてきており、ベンゾピラン誘導体（例えば、特開平7-291983号公報参照。）、フェニル置換ヒドロキシシクロペンテノン類縁体（例えば、特開平11-43460号公報参照。）、プロスタグランジンA1類縁体（例えば、特開平11-43461号公報参照。）、ベンゾチエピン誘導体（例えば、特開2000-109480号公報参照。）、クロモン誘導体（例えば、特開2001-139571号公報参照。）による骨形成促進作用が開示されている。しかし、有効性、安全性の評価は未だ十分ではなく、実用段階には至っていない。

骨基質中に骨形成を誘導する蛋白性因子が含まれていることが発見され、骨形

成タンパク質 (bone morphogenetic protein、以下、BMPと称することがある) と名づけられた。その本体は長い間不明であったが、4種のBMP遺伝子がクローニングされたのを契機に、現在では十数種の分子種が種を超えて広く動物に存在することがわかってきた。BMPは、前骨芽細胞に作用し、アルカリ性フォスファターゼ活性、副甲状腺ホルモンに対する応答性、オステオカルシン産生、コラーゲン合成等を上昇させて骨芽細胞への分化を誘導する。BMPは、多分化能を有する未分化間葉系細胞の分化段階に応じて軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞への分化の振り分けを行う。BMPは筋芽細胞の筋肉への分化を抑制し、骨芽細胞への分化へと変換させる。また、BMPには骨芽細胞からのインスリン様増殖因子等の二次的増殖因子の誘導活性が知られている。BMPを担体とともに皮下や筋肉内に投与することにより骨形成が誘導される。組換えヒトBMPのうちBMP-2、-4、-5、-6、-7には単独で骨形成を誘導する活性が認められている。中でも組換えヒトBMP-2は強力な骨形成活性を有し、ラット、ヒツジ、イヌ、サルなどの骨欠損モデルにおいて欠損組織を回復することが知られている。また、BMP-4、-5には骨折治癒過程への関与が、BMP-6には軟骨内骨化への関与が報告されており、BMP-12には靱帯、腱形成活性が、BMP-13には軟骨形成活性があることが知られている。さらに、老齢動物や高齢者では骨基質中のBMP量の低下や、骨芽細胞のBMPに対する感受性の低下が認められることから、BMPの老人性骨粗鬆症への関わりが指摘されている。

BMPは骨形成だけではなく、発生過程においても重要な働きを担っており、BMP-2、-4、-7、-8、-11等は背腹軸形成や中胚葉形成、心臓形成、腎臓形成、眼形成、精子形成等に関与している。BMPのノックアウト動物は致死もしくは重篤な障害を示す。このようにBMPは生体にとって必須であり多彩な生理活性を有していることが知られている。

BMPは前記各種作用を示すことから、BMP自体を直接、蛋白製剤として骨

粗鬆症や骨折治療等に利用する試みもなされてきている。しかし、BMPはタンパク質であるので、投与方法の制限や耐性の出現などが問題となる。またBMPの受容体は多くの組織に広く発現しているので、全身投与した場合には骨以外の組織への影響が生じる恐れがある。これらの欠点により、BMPそのものを治療薬として実用化するには種々の制限が伴う。しかし、BMPを外から投与するのではなく、所望の組織部位で任意にBMPの産生を増強させることができるのであれば、骨粗鬆症や骨折等、BMP産生増強を必要とする疾患の治療、予防に有効であると考えられる。近年、2つの芳香族系を含む特定の化合物（例えば、国際公開第97/15308号パンフレット参照。）やネバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチンおよびシンバスタチンなどのスタチン系化合物（例えば、国際公開第98/25460号パンフレット参照。）がBMP-2産生増強活性を有することが開示されている。また、ヘリオキサントニン（例えば、特開平8-245386号公報参照。）や縮合チオフェン誘導体（例えば、特開平9-151132号公報参照。）にBMPの作用を増強する活性があることが開示されている。ただし、これらについては安全性、有効性の評価は未だ十分ではなく、実用段階には至っていない。

近年、BMPを骨再生医療に利用する開発が行われており、BMPと担体との複合体をインプラント材と組み合わせて骨折箇所に埋め込むことで治療効果を得ようという試みもなされてきている。しかし、大量のBMPを生体内に持ち込むことになる為、安全性、経済性の面からも問題が生じる。BMPのかわりに、BMPの産生を増強したり、骨形成を促進したりする物質を用いることによりその欠点を回避できると考えられるが、未だ実用に十分な手段は知られていない。

このように、骨形成を促進したり、BMP産生を増強することで、それらが関連する種々の疾患の治療または予防が可能になると考えるが、毒性や副作用を示さず所望により適切に骨形成促進やBMP産生増強を行い得る、物質、手段等は未だ知られていない。

アシタバはセリ科の大型多年性草木であり、さまざまな健康促進効果が知られている。例えば、アシタバの有する生理活性としては、高血圧予防効果、抗菌作用、抗腫瘍作用、胃酸分泌抑制作用、抗癌効果、神経成長因子産生増強効果、肝細胞増殖因子産生増強作用が知られている（例えば、国際公開第01/76614号パンフレット参照。）。しかし、骨形成促進作用、BMP産生増強作用については知られていない。

セロリはセリ科に属するさまざまな生理作用が知られている植物である。セロリの生理作用としては、抗血液凝固作用、制がん作用等が知られている。しかし、骨形成促進作用、BMP産生増強作用については知られていない。

ユリはユリ科に属するさまざまな生理作用が知られている植物である。ユリの生理作用としては、消炎、利尿作用、鎮咳作用、鎮静作用等が知られている。しかし、骨形成促進作用、BMP産生増強作用については知られていない。

アロエはユリ科に属するさまざまな生理作用が知られている植物である。アロエの生理作用としては、抗腫瘍作用、マイトジェン活性、免疫増強活性、凍傷治癒作用、抗菌作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用、やけどの治癒作用、血糖値降下作用、保湿作用等が知られている。しかし、骨形成促進作用、BMP産生増強作用については知られていない。

ヨモギはキク科に属するさまざまな生理作用が知られている植物である。ヨモギの生理作用としては、抗菌作用、鎮静作用、活性酸素消化作用、止血作用、抗ヒスタミン作用等が知られている。しかし、骨形成促進作用、BMP産生増強作用については知られていない。

発明の開示

本発明の目的は、天然物由来で安全で、簡便に摂取可能な、食品素材、医薬品素材として適した骨形成促進作用または骨形成タンパク質産生増強作用を有する組成物を開発し、当該組成物を用いた、医薬、食品、飲料または飼料を提供する

ことにある。

本発明を概説すれば、本発明の第1～3の発明は、下記(a)～(c)から選択される植物由来処理物を有効成分として含有することを特徴とする骨形成促進または骨形成タンパク質産生増強を要する疾患の治療剤又は予防剤、骨形成促進剤またはBMP産生増強剤、骨形成促進用またはBMP産生増強用の食品、飲料又は飼料に関する。

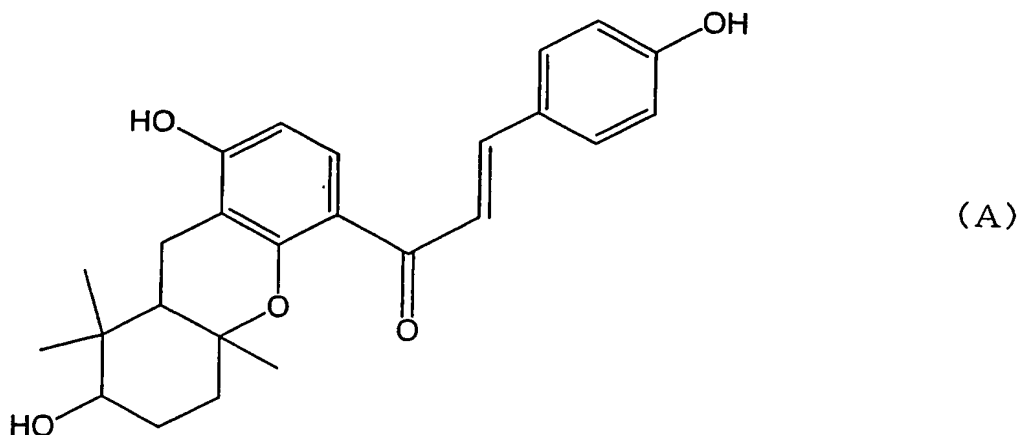
(a) セリ科植物由来処理物

(b) ユリ科植物由来処理物

(c) キク科植物由来処理物

本発明の第1～3の発明において、植物としては、アシタバ、セロリ、ユリ、アロエ又はヨモギが好適に使用される。

本発明の第4～6の発明は以下の式(A)で表される化合物、その誘導体又はそれらの塩を有効成分として含有することを特徴とする骨形成促進またはBMP産生増強を要する疾患の治療剤又は予防剤、骨形成促進剤またはBMP産生増強剤、骨形成促進用またはBMP産生増強用の食品、飲料又は飼料に関する。



本発明の第 7 の発明は、下記工程を包含することを特徴とする BMP 産生増強作用の測定方法に関する。

(a) 被験物質と接触させた条件下で、HuO9 細胞もしくはその亜株、またはこれらのうちいずれか 1 種の細胞株を用いて得られたハイブリドーマを培養する工程、および

(b) 工程 (a) で得られた培養液中の BMP 量を被験物質の BMP 産生増強作用の指標として測定する工程

本発明の第 8 の発明は、下記工程を包含することを特徴とする BMP 産生増強作用を有する物質のスクリーニング方法に関する。

(a) 被験物質と接触させた条件下で、HuO9 細胞もしくはその亜株、またはこれらのうちいずれか 1 種の細胞株を用いて得られたハイブリドーマを培養する工程、および

(b) 工程 (a) で得られた培養液中の BMP 量を測定する工程、ここで、被験物質と接触させない条件下または BMP 産生増強作用を有する対照物質と接触させた条件下で前記細胞を培養した時と比べて、BMP 量が多い場合、被験物質が BMP 産生増強作用を有すると判定する

本発明の第 9 の発明は、下記工程を包含することを特徴とする BMP 産生増強作用を有する物質の製造方法に関する。

(a) BMP 産生増強作用を有する物質を得る工程、および

(b) 本発明の第 7 の発明の測定方法を用いて、工程 (a) で得られた物質の BMP 産生増強作用を測定する工程

また、本発明は、下記工程を包含することを特徴とする BMP 産生増強作用を有する物質の製造方法に関する。

(a) 被験物質と接触させた条件下で、HuO9 細胞もしくはその亜株、またはこれらのうちいずれか 1 種の細胞株を用いて得られたハイブリドーマを培養する工程、および

(b) 工程 (a) で得られた培養液中の BMP 量を測定する工程、ここで、被験物質と接触させない条件下または BMP 産生増強作用を有する対照物質と接触させた条件下で前記細胞を培養した時と比べて、BMP 量が多い場合、被験物質が BMP 産生増強作用を有すると判定し、該被験物質を BMP 産生増強作用を有する物質として取得する

図面の簡単な説明

第 1 図は、化合物 a の質量スペクトルを示す図である。

第 2 図は、化合物 a の ^1H -NMR スペクトルを示す図である。

第 3 図は、化合物 a の ^{13}C -NMR スペクトルを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において、「BMP 産生増強作用」及び「BMP 産生増強活性」はそれぞれ BMP 産生増強をもたらすこと及び BMP 産生を増強する機能をいうが、その意味において特に厳密に区別するものではない。「増強」には、本発明に係る有効成分の作用前に比し、作用後において目的物質の量が増加するという態様と共に、本発明に係る有効成分を作用させることにより目的物質を生起せしめるという態様（誘導）を含む。また本明細書において、有効成分として挙げるいずれの物質も単独でもしくは 2 種以上混合して本発明において用いることができる。

本発明の有効成分としては、セリ科植物由来処理物、ユリ科植物由来処理物、およびキク科植物由来処理物から選択される植物由来処理物が用いられる。

本発明において、セリ科植物とは、被子植物類セリ科に属する植物であって、例えばアシタバ、セロリ、セリ、ミツバ、シシウド、ニンジン等が例示される。本発明においては、セリ科の大型多年生草本であるアシタバ、セロリが特に好適に使用できる。

本発明において、ユリ科植物としては、アロエ、ユリ、ホトトギス、シライソウ、オゼソウ、ショウジョウバカマ、キスゲ、ギボウシ、ネギ、ニンニク、ニラ、クロユリ、チューリップ、カタクリ、アマナ、アマドコロ、タケシマラン、ツバメオモト、ユキザサ、マイズルソウ、チゴユリ、エンレイソウ、ツクバネソウ、オモト、ジャノヒゲ、ヤブラン、ソクシンラン、イヌサフラン、ツルボ、スイセン、クンシラン、ヒガンバナ、ハマオモト等が例示される。本発明においては、アロエおよびユリが特に好適に使用される。

なお、アロエとは、アロエ属に分類されるもの、例えばケープアロエ、キダチアロエ、アロエベラ等のいずれも使用できる。また、キダチアロエは植物分類学上、キダチロカイと称されることもあるが、これも本明細書中のアロエに包含されるものである。また、ユリとは、ユリ属に分類されるもの、例えばテッポウユリ、カノコユリ、スカシユリ、ヤマユリ、オニユリ等のいずれも使用できる。

本発明において、キク科植物としては、ヨモギ、サザバルヨモギ、アザミ、ゴボウ、シュンギク、ハルジオン、シオン、ヨメナ、フジバカマ、ブタクサ、オナモミ、ダリア、コスモス、ヒマワリ、ハハコグサ、ウスユキソウ、ガーベラ、フキ、ウサギギク、キオン、ショウジョウハグマ、ニガナ、アキノノゲシ、タンポポ、フタマタタンポポ等が例示される。本発明においては、特に好適にはヨモギ、サザバルヨモギが使用される。

また、本発明に使用される植物は、特に限定はないが、その果実、種子、種皮、花、葉、茎、根、根茎及び／又は植物体そのままを使用することができる。

本発明において、植物由来処理物としては、骨形成促進作用またはBMP産生増強作用を有していれば特に限定はないが、例えば抽出物、粉碎物、搾汁液、破砕物、化学処理物、酵素処理物をいい、特に好適には抽出物、粉碎物および搾汁液が例示される。本発明の有効成分として使用され得るものであれば、植物由来処理物の形態に特に限定はない。

本発明において、抽出物とは抽出溶媒を用いて抽出操作を行う工程を経て得ら

れる物質のことをいう。抽出は、公知の抽出方法により以下のように行うことができる。例えば原料を粉碎もしくは細断した後、溶媒を用いてバッチ式もしくは連続式で抽出を行うことができる。抽出物を得る際の抽出溶媒としては、特に限定はないが、水、ヘキサン、クロロホルム、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、酢酸メチル、酢酸エチル等の親水性もしくは親油性の溶媒を挙げることができ、所望により単独で、もしくは適宜混合液として用いることができる。抽出溶媒の量は適宜決定すればよいが、通常、抽出操作に供する際の原料の重量に対し、好ましくは0.1～100倍量の抽出溶媒を使用すれば良い。抽出温度も適宜、目的に応じて決定すればよいが、水抽出の場合は通常、好ましくは4～130℃、より好ましくは25～100℃である。また、溶媒中にエタノールが含まれる場合は4～60℃の範囲が好適である。抽出時間も、抽出効率を考慮し決定すればよいが、通常、好ましくは数秒間～数日間、より好ましくは5分間～24時間の範囲となるように、原料、抽出溶媒、抽出温度を設定するのが好適である。抽出時の圧力は、特に限定はなく、所望により適宜決定することができる。抽出操作は、例えば常圧下でも加圧下でも吸引濾過等による減圧下でも所望により条件を選択して行うことができる。抽出操作は、たとえば、攪拌しながら又は静置して行えばよく、また、必要に応じて数回繰り返してもよい。以上の操作により、本発明で使用される植物由来の抽出物（以下、本発明の抽出物と称することがある。）が得られる。抽出物は必要に応じ、ろ過、遠心分離、濃縮、限外ろ過、分子ふるい等の処理を行い、目的の骨形成促進作用またはBMP産生増強作用を有する成分（以下、それぞれ骨形成促進成分またはBMP産生増強成分という）が濃縮された抽出物を調製することができる。抽出物や濃縮抽出物の骨形成促進作用またはBMP産生増強作用は、後述の実施例2又は4記載の方法に準じて簡便に測定することができる。また、本発明で使用される植物を公知の方法で茶葉状にし、これを用いて得られた抽出物も骨形成促進作用またはBMP産生増強作用

を有していれば、本発明の抽出物として使用することができる。なお、本発明においては異なった抽出法で得られた抽出物を2種以上併用することもできる。

また、本発明においては、本発明で使用される植物由来の抽出物を公知の方法で分画することによって得られる画分や、分画操作を複数回繰り返すことにより得られる画分も本発明の抽出物に包含される。上記の分画手段としては、抽出、分別沈殿、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等が挙げられる。得られた画分の精製を、骨形成促進作用またはBMP産生増強作用を指標としてさらに進めることにより、骨形成促進成分またはBMP産生増強成分を単離することもできる。それらの成分も本発明の有効成分に包含される。

また、植物由来の抽出物以外の植物由来処理物としては、植物由来の粉碎物が挙げられる。粉碎物の製造方法としては、例えば植物を乾燥させ、粉碎することで粉状の植物由来の粉碎物を得ることができる。

また、植物由来の搾汁液の製造方法としては、公知の植物の搾汁方法が挙げられ、特に限定はないが、例えばスクリー式、ギア式、カッター式等の搾り機やジューサーを用いる方法が挙げられる。また、前処理として原料を細断あるいはすりつぶした後、上述のジューサー又は布等で絞って搾汁液を得ることもできる。

破砕物とは、有効成分の原料として用いられる植物を碎き壊したものであり、一般には粉碎物よりも組織片が大きく、例えば、破砕機を使用することにより製造することができる。また、化学処理物とは、特に限定はないが、該植物を酸処理、アルカリ処理、酸化処理、還元処理等に供して得られた物をいい、例えば、塩酸、硫酸、硝酸、クエン酸、酢酸等の無機酸や有機酸、又は水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア等の無機塩基や有機塩基を含む水溶液に該植物を浸漬することにより製造することができる。化学処理物には、前記のような化学処理を受けた植物体に由来するすべてのものを含む。酵素処理物とは、例えば、ペクチナーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、アミラーゼ、マンナーゼ、グルコ

シダーゼ等による酵素処理物、微生物による酵素反応物（例えば、発酵物）をいい、例えば、該植物に対して上記酵素を適当な緩衝液中で作用させることにより製造することができる。酵素処理物には、前記のような酵素処理を受けた植物体に由来するすべてのものを含む。さらに、本発明の植物由来処理物としては、例えば、前記植物の茎を切断し、その切断面から得られる汁液も包含される。

本発明において、植物由来処理物の形状としては、骨形成促進作用またはBMP産生増強作用を有していれば特に限定はないが、粉状、固形状、液状のいずれの形状であってもよい。また、当該処理物を公知の方法で造粒して粒状の固形物として、本発明の植物由来処理物として使用することができる。造粒方法としては、特に限定はないが、転動造粒、攪拌造粒、流動層造粒、気流造粒、押出し造粒、圧縮成型造粒、解砕造粒、噴射造粒又は噴霧造粒等が例示される。粉状の当該植物由来処理物を液体、例えば水やアルコール等に溶解して液状とし、本発明の植物由来処理物として使用することもできる。

本発明における植物由来処理物は、原料である植物体そのものと比較して骨形成促進成分またはBMP産生増強成分を高濃度及び／又は高純度に含有するものが特に好ましい。ここで高濃度とは、原料である植物体の単位重量あたりの骨形成促進成分またはBMP産生増強成分の重量よりも植物由来処理物の単位重量あたりの骨形成促進成分またはBMP産生増強成分の重量の方が多いことを意味する。また、高純度とは、原料である植物体と比較して、骨形成促進成分またはBMP産生増強成分の含有率が植物由来処理物で高いことを意味する。

また、本発明は植物由来処理物を高濃度及び／又は高純度に含有する食品、飲料又は飼料を提供するが、これは従来の食品、飲料又は飼料と比べて、本発明の食品、飲料又は飼料中に骨形成促進成分またはBMP産生増強成分が高濃度及び／又は高純度に含有されている食品、飲料又は飼料を提供することを意味する。

また、本発明においては、セリ科植物由来処理物から得られ得る上記式（A）で表される化合物、その誘導体又はそれらの塩（以下、本発明の化合物という場

合がある)を、本発明の治療剤、予防剤、骨形成促進剤、BMP産生増強剤、食品、飲料又は飼料の有効成分として使用することもできる。本発明の化合物は、それぞれ単独でもしくは2種以上を混合して使用することができる。当該化合物は、前述の公知の分画方法によりセリ科植物から精製したものでもよく、また化学的に半合成もしくは合成されたものでも良い。

式(A)で表される化合物の具体的な製造方法としては、下記実施例1に記載の方法が例示される。また、例えば、天然物由来のカルコン類化合物を原料として有機合成することにより半合成品が得られ、全てを有機合成することにより合成品が得られる。有機合成の方法は、例えば、Alessandra Lattanzi et al., Synlett, 2002, No. 6, p942-946; L. Claisen A. et al., Ber. 1881, No. 14, p2460等を参照すればよい。

本明細書において上記式(A)で表される化合物の誘導体とは、該化合物を元化合物として合成される化合物であって、式(A)で表される化合物と同等の作用、すなわち、骨形成促進作用またはBMP産生増強作用を有する化合物である。かかる誘導体としては、例えば上記式(A)で表される化合物のエステル体、エーテル体、配糖体など、体内で容易に加水分解し、所望の効果を発揮し得る化合物(プロドラッグ)を挙げることができる。かかるプロドラッグの調製は公知の方法に従えばよい。なお、かかる誘導体は、それらの塩であってもよい。

また、本発明の化合物において、塩としては薬理学的に許容される塩が好ましい。本発明で使用される塩としては、例えば、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、有機塩基との塩などが例示される。かかる塩としては薬理学的に許容される塩が好ましい。なお、本発明において使用される薬理学的に許容される塩とは生物に対して実質的に無毒である塩を意味する。当該塩としては、たとえば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウムまたはプロトン化されたベンザチン(N, N'-ジベンジルエチレンジアミン)、コリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグラミン(N-メ

チルグルカミン)、ベネタミン(N-ベンジルフェネチルアミン)、ピペラジンもしくはトロメタミン(2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール)との塩が挙げられる。

なお、本発明において、本発明で使用される植物由来処理物及び／又は本発明の化合物を本発明の有効成分と称し、本発明の有効成分を含有する骨形成促進またはBMP産生増強を要する疾患の治療剤又は予防剤を本発明の治療剤又は予防剤と称することがある。

本発明に係る有効成分には、後述するように特に毒性は認められない。また、副作用の発生の心配もない。それゆえ、該有効成分を用いれば、安全かつ適切に疾患の治療又は予防を行うことができる。従って、当該有効成分を含んでなる本発明の治療剤、予防剤、骨形成促進剤、BMP産生増強剤、食品、飲料または飼料は、骨形成促進またはBMP産生増強を要する疾患の治療または予防に有効である。

本発明において骨形成促進作用とは、骨や軟骨の形成作用を促すものであれば特に限定はなく、例えば、間葉系幹細胞からの骨芽細胞への分化促進作用、未分化間葉系細胞からの骨芽細胞への分化促進作用、前骨芽細胞からの骨芽細胞への分化促進作用、骨基質の形成促進作用、骨基質の石灰化作用、骨芽細胞からの骨細胞への分化促進作用、軟骨内骨化誘導作用等が例示される。また、骨形成促進作用の有無については、特に限定はないが、後述の実施例2に記載の方法により、例えば、間葉系幹細胞からの骨芽細胞への分化促進作用として簡便に測定することができる。ここで、「促進」には「誘導」を含む。

本発明において、BMPとしては、例えばBMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、BMP-13、BMP-14、BMP-15等が例示され、特に好適にはBMP-2、BMP-4またはBMP-7が例示される。また、BMP産生増強作用の有無については、特に限定は

ないが、後述の実施例 4 に記載の方法により簡便に測定することができる。

BMP は骨、軟骨、靱帯、腱などの形成を強く促進する因子であり、前骨芽細胞に作用し骨芽細胞への分化を促進し、骨の発生、成長、リモデリング、骨折の治癒過程に関与しているものと考えられている。また、BMP は未分化間葉系細胞に作用し、分化段階に応じて軟骨芽細胞、骨芽細胞、脂肪細胞への分化の振り分けを行うことにより、広く間葉系由来細胞の成熟と増殖に関与している。さらに、BMP は個体の発生過程においても、背腹軸形成や中胚葉形成等に重要な働きを担っている。BMP の中でも BMP-2、-4、-7 は特に骨形成活性が強く、組換えヒト BMP-2 は骨欠損動物に作用して骨欠損を回復することができる。組換えヒト BMP-2 の詳細については、例えば、J. M. Wozney et al., Science Vol. 242 p1528-1534 (1988) を参照のこと。また、歯科領域においては、BMP-2 による歯槽骨セメント質や歯根膜組織等の歯周組織の再生が確認されている。

本発明において、骨形成促進または BMP 産生増強を要する疾患としては、例えば、骨粗鬆症（例えば、慢性骨粗鬆症、閉経後のホルモンバランス異常により起こる骨粗鬆症、糖尿病やステロイド剤等の副作用に伴う続発性骨粗鬆症等）、骨折、再骨折、骨欠損、骨形成不全症、骨軟化症、骨ペーチェット病、硬直性脊髄炎、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、軟骨が関与する変形性関節症、歯周病、歯周疾患における歯周組織欠損、歯根・歯槽欠損、顎堤形成、口蓋裂の修復が例示される。また、本発明の治療剤または予防剤は、多発性骨髄腫、肺癌、乳癌等の外科手術後の骨組織修復剤として使用することもできる。さらには、本発明の治療剤または予防剤は再生医療分野における骨再生目的にも使用することができる。具体的には、本発明の治療剤または予防剤は、人工骨や人工歯根の活性化・安定化に使用することができ、また疾患を有する前の、もしくは疾患を有する患者の生体内から細胞をとり、体外で本発明の治療剤または予防剤を作用させて、再生骨組織を形成させた後、再び患者の生体内にもどすこともできる。

本発明の治療剤または予防剤としては、本発明に係る前記有効成分を公知の医薬と組み合わせて製剤化したものが挙げられる。本発明の有効成分は、例えば、骨の吸収を阻害する薬剤、例えばエストロゲン、カルシトニン、活性型ビタミンD₃、ビスホスホネート等と共に使用することができる。その他、本発明の有効成分をBMPと共に使用することもできる。これにより、実施例13に記載の通り、骨形成促進に関して相乗効果を期待することができる。ここで、BMPとしては、前記組換えヒトBMP-2が好適に使用される。よって、本発明の治療剤または予防剤の好適な態様として、前記植物由来処理物および／または本発明の化合物と組換えヒトBMP-2を含有してなるものが挙げられる。なお、かかる構成は、本発明の骨形成促進剤、BMP産生増強剤、食品、飲料、飼料においても好適な態様である。

本発明の治療剤または予防剤の製造は、通常、前記有効成分を薬学的に許容できる液状または固体状の担体と配合することにより行われ、所望により溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。また、使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品や、その他、外用剤とすることもできる。

医薬用担体は、治療剤または予防剤の投与形態および剤型に応じて選択することができる。固体組成物からなる経口剤とする場合は、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤等とすることができ、たとえば、デンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩などが利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料などを配合することもできる。たとえば、錠剤または丸剤とする場合は、所望によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロースなどの糖衣または胃溶性もしくは腸溶性物質のフィルムで被覆してもよい。液体組成物からなる経口剤とする場合は、薬理学的に許容される

乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などとすることができ、例えば、精製水、エタノールなどが担体として利用される。また、さらに所望により湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、防腐剤などを添加してもよい。

一方、非経口剤とする場合は、常法に従い本発明の前記有効成分を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、落花生油、大豆油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどに溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤などを加えることにより調製することができる。また、固体組成物を製造し、使用前に無菌水または無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

外用剤としては、経皮投与用または経粘膜（口腔内、鼻腔内）投与用の、固体、半固体状または液状の製剤が含まれる。また、座剤なども含まれる。例えば、乳剤、ローション剤などの乳濁剤、外用チンキ剤、経粘膜投与用液剤などの液状製剤、油性軟膏、親水性軟膏などの軟膏剤、フィルム剤、テープ剤、パップ剤などの経皮投与用または経粘膜投与用の貼付剤などとすることができる。

以上の各種製剤は、それぞれ公知の医薬用担体などを利用して、適宜、常法により製造することができる。また、かかる製剤における有効成分の含有量は、その投与形態、投与方法などを考慮し、好ましくは後述の投与量範囲で当該有効成分を投与できるような量であれば特に限定されるものではない。例えば、本発明で原料として使用される植物の乾燥物 1 g から、抽出溶媒として 20 ml の水を用いた抽出操作で得られる抽出物を 5 ml に濃縮したものを有効成分とした場合、治療剤または予防剤 100 重量% 中、通常、0.001～100 重量%、好ましくは 0.01～90 重量%、より好ましくは 0.1～80 重量% である。また、有効成分として本発明の化合物を使用する場合、特に限定はないが、治療剤または予防剤 100 重量% 中、通常、0.000001～100 重量%、好ましくは 0.00001～90 重量%、より好ましくは 0.0001～80 重量% である。

なお、本発明の有効成分を前記組換えBMP-2と併用する場合、組換えBMP-2は、有効成分100重量部に対し、通常、0.1～100000重量部程度使用するのが好適である。かかる有効成分と組換えBMP-2との併用時の割合は、後述の骨形成促進剤、BMP産生増強剤、食品、飲料、飼料についても同様である。

本発明の治療剤または予防剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用および注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内などに投与し得、外用剤では、たとえば、座剤をその適する投与方法により投与すればよい。

本発明の治療剤または予防剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的および当該治療剤または予防剤の投与対象である患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され一定ではない。一般には、製剤中に含有される前記有効成分の投与量で、例えば本発明で原料として使用される植物の乾燥物1gから、抽出溶媒として20mlの水を用いた抽出操作で得られる抽出物を5mlに濃縮したものを有効成分とした場合、ヒト（例えば成人）1日当たり0.0001mg～2000mg/kg体重、好ましくは0.001mg～1000mg/kg体重、より好ましくは0.01mg～100mg/kg体重である。また、有効成分として本発明の化合物を使用する場合、特に限定はないが、ヒト（例えば成人）1日当たり0.0001μg～2000mg/kg体重、好ましくは0.001μg～1000mg/kg体重、より好ましくは0.01μg～100mg/kg体重である。もちろん投与量は、種々の条件、例えば抽出溶媒の種類、使用した溶媒の使用量等によっても変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。投与は、所望の投与量範囲内において、1日内において単回で、または数回に分けて行ってもよく、所定期間に渡って行ってもよい。また、本発明の治療剤または予防剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

また、本発明は前記有効成分を含む骨形成促進剤およびBMP産生増強剤を提供することもできる。当該骨形成促進剤およびBMP産生増強剤としては、前記有効成分そのものであってもよく、また、前記有効成分を含む組成物であってもよい。骨形成促進剤およびBMP産生増強剤は、たとえば、前記有効成分を当該有効成分と同じ用途に使用可能な他の成分などと配合し、上記治療剤または予防剤の製造方法に準じて通常使用される試薬の形態に製造すればよい。かかる骨形成促進剤またはBMP産生増強剤における前記有効成分の含有量は、当該骨形成促進剤またはBMP産生増強剤の投与方法、使用目的などを考慮し、本発明の所望の効果の発現が得られ得るような量であればよく、特に限定されるものではない。例えば、本発明で原料として使用される植物の乾燥物1gから、抽出溶媒として20mlの水を用いた抽出操作で得られる抽出物を5mlに濃縮したものを有効成分とした場合、骨形成促進剤またはBMP産生増強剤100重量%中、通常、0.001~100重量%、好ましくは0.01~90重量%、より好ましくは0.1~80重量%である。また、有効成分として本発明の化合物を使用する場合、特に限定はないが、骨形成促進剤またはBMP産生増強剤100重量%中、通常、0.000001~100重量%、好ましくは0.00001~90重量%、より好ましくは0.0001~80重量%である。

該骨形成促進剤またはBMP産生増強剤の使用量も、本発明の所望の効果の発現が得られ得るようであれば特に限定されるものではない。特に、生体に投与して使用する場合には、好ましくは前記治療剤または予防剤における有効成分の投与量範囲内で有効成分を投与できるような量で使用すればよい。本発明の骨形成促進剤またはBMP産生増強剤は、骨形成促進またはBMP産生増強に関与する疾患において有用である。

また、本発明の骨形成促進剤またはBMP産生増強剤は、インプラントに含有させて使用することができる。これにより、例えば骨折においては、当該インプラントを使用することにより、骨接合を促進させ、それゆえに骨折の治癒または

インプラントと骨組織との統合を加速させることができる。なお、ここでインプラントとは、外科手術の過程で体内に少なくとも部分的に導入される器具を意味し、関節、骨、歯、靱帯もしくは腱等の切断や損傷に対して使用されるものである。また、インプラントは体内に永久に残っていてもよく、また生物によって再吸収されてもよい。ここで、本発明の骨形成促進剤またはBMP産生増強剤はインプラントの内部に含有させてもよいし、またインプラント表面にコーティングして含有させても良い。本発明の骨形成促進剤またはBMP産生増強剤の含有量は所望の効果が得られるように適宜設定すればよい。インプラントは、本発明の有効成分を用いて公知の方法により作製することができる。

また、本発明の骨形成促進剤またはBMP産生増強剤は、ハミガキに含有させて使用することもできる。当該ハミガキは本発明の骨形成促進作用またはBMP産生増強作用により、歯周組織の再生を行い、歯周炎の予防や歯の再石灰化を促進させることができる。本発明の骨形成促進剤またはBMP産生増強剤の含有量は所望の効果が得られるように適宜設定すればよい。ハミガキは、本発明の有効成分を用いて公知の方法により作製することができる。

また、当該骨形成促進剤またはBMP産生増強剤は、骨に関与する疾患に対する薬物のスクリーニングにも有用である。さらに当該骨形成促進剤またはBMP産生増強剤は、骨の物理的変化に関する機能研究にも有用である。

本発明に係る有効成分には、後述するように特に毒性は認められない。また、副作用の発生の心配もない。それゆえ、該有効成分によれば、安全かつ適切に骨形成促進作用またはBMP産生増強作用を発現させることができる。従って、当該有効成分を含んでなる本発明の医薬、食品、飲料または飼料は、骨形成促進またはBMP産生増強を要する疾患の治療または予防に有効である。

また、本発明は、前記有効成分を含有してなる骨形成促進用またはBMP産生増強用の食品、飲料又は飼料を提供する。ここで、「含有」とは、含有、添加および／または希釈を意味する。本発明の食品、飲料または飼料は、その骨形成促

進作用またはBMP産生増強作用により、骨形成促進またはBMP産生増強を要する疾患の症状改善、予防に極めて有用である。

なお、本明細書において、前記「含有」とは食品、飲料または飼料中に本発明で使用される有効成分が含まれるという態様を、前記「添加」とは食品、飲料または飼料の原料に、本発明で使用される有効成分を添加するという態様を、前記「希釈」とは本発明で使用される有効成分に、食品、飲料または飼料の原料を添加するという態様をいうものである。

本発明の食品、飲料または飼料の製造法に特に限定はない。たとえば、配合、調理、加工などは一般の食品、飲料または飼料のものに従えばよく、それらの製造法により製造することができ、得られた食品、飲料または飼料に骨形成促進作用またはBMP産生増強作用を有する本発明に係る前記有効成分が含有されていれば良い。

本発明の食品または飲料としては特に限定はないが、たとえば、本発明に係る前記有効成分が含有されてなる、穀物加工品（小麦粉加工品、デンプン類加工品、プレミックス加工品、麺類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麩、ビーフン、はるさめ、包装餅など）、油脂加工品（可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシングなど）、大豆加工品（豆腐類、味噌、納豆など）、食肉加工品（ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージなど）、水産製品（冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮など）、乳製品（原料乳、クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリームなど）、野菜・果実加工品（ペースト類、ジャム類、漬け物類、果実飲料、野菜飲料、ミックス飲料など）、菓子類（ガム、飴、チョコレート、ビスケット類、菓子パン類、ケーキ、餅菓子、米菓類など）、アルコール飲料（日本酒、中国酒、ワイン、ウイスキー、焼酎、ウオッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、清涼アルコール飲料、果実酒、リキュールなど）、嗜好飲料（緑茶、紅茶、ウー

ロン茶、コーヒー、清涼飲料、乳酸飲料など）、調味料（しょうゆ、ソース、酢、みりんなど）、缶詰・瓶詰め・袋詰め食品（牛飯、釜飯、赤飯、カレー、その他の各種調理済み食品）、半乾燥または濃縮食品（レバーペースト、その他のスプレッド、そば・うどんの汁、濃縮スープ類）、乾燥食品（即席麺類、即席カレー、インスタントコーヒー、粉末ジュース、粉末スープ、即席味噌汁、調理済み食品、調理済み飲料、調理済みスープなど）、冷凍食品（すき焼き、茶碗蒸し、うなぎかば焼き、ハンバーグステーキ、シュウマイ、餃子、各種スティック、フルーツカクテルなど）、固形食品、液体食品（スープなど）、香辛料類などの農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品などが挙げられる。また、本発明の食品としては、特にガム、飴類等が好適である。かかる食品は、口内において一定時間咀嚼されることから、それらに本発明の有効成分が含有されておれば、本発明の有効成分により奏される効果、例えば、歯周組織の再生効果、歯の再石灰化促進効果をより効果的に発現させることができる。

本発明の食品または飲料には前記有効成分が単独もしくは複数含有、添加および／または希釈されており、その骨形成促進作用またはBMP産生増強作用を発現するための必要量が含まれていれば特にその形状に限定はなく、タブレット状、顆粒状、カプセル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

また、本発明の飲料については、本発明の有効成分と、セリ科、ユリ科及びキク科以外の植物、例えばこれら以外の野菜や果実等の搾汁液と混合もしくは、これらと同時に搾汁して健康飲料とすることもできる。例えば、アシタバ、セロリ、ユリ、アロエ又はヨモギの搾汁液を水で希釈したり、小松菜、カブ、チンゲンサイ、トマト、ミカン、レモン、グレープフルーツ、キウイ、ほうれん草、ラディッシュ、大根、白菜、キャベツ、サラダ菜、レタス、オクラ、ピーマン、キュウリ、インゲン、えだまめ、エンドウ、トウモロコシ、ルッコラ、ビワ、夏みかん、甘夏等の搾汁液、牛乳、豆乳等と混合したりして骨形成促進作用またはBMP産生増強作用を有する健康飲料とすることができる。

また、本発明の飲料の一態様であるアルコール飲料としては、本発明で使用されるセリ科植物、ユリ科植物及び／又はキク科植物、例えばアシタバ、セロリ、ユリ、アロエ及び／又はヨモギを飲用のアルコール類に浸漬したものを、そのままもしくは公知のアルコール飲料の製造方法に準じて得られるアルコール飲料として飲用に供することもできる。

さらに、本発明で有効成分として使用される植物由来処理物、例えば、粉碎物や破砕物を公知の方法に従って錠剤等の形態に成形したものも本発明の食品に含まれる。

本発明の食品又は飲料中の前記有効成分の含有量は特に限定されず、その官能と活性発現の観点から適宜選択できるが、例えば本発明で原料として使用される植物の乾燥物 1 g から、抽出溶媒として 20 ml の水を用いた抽出操作で得られる抽出物を 5 ml に濃縮したものを有効成分とした場合、食品 100 重量%中、0.1 重量%以上、好ましくは 1～100 重量%、より好ましくは 6～100 重量%であり、飲料 100 重量%中、0.1 重量%以上、好ましくは 1～100 重量%、より好ましくは 6～100 重量%である。また、有効成分として本発明の化合物を使用する場合、特に限定はないが、食品 100 重量%中、0.0001 重量%以上、好ましくは 0.001～50 重量%、より好ましくは 0.006～10 重量%であり、飲料 100 重量%中、0.0001 重量%以上、好ましくは 0.001～50 重量%、より好ましくは 0.006～10 重量%である。また本発明の食品又は飲料は、好ましくはそれらに含有される有効成分が、例えば本発明で原料として使用される植物の乾燥物 1 g から、抽出溶媒として 20 ml の水を用いた抽出操作で得られる抽出物を 5 ml に濃縮したものを有効成分とした場合、ヒト（例えば成人）1日当り 0.0001 μ g～2000 mg/kg 体重、好ましくは 0.001 μ g～1000 mg/kg 体重、より好ましくは 0.01 μ g～100 mg/kg 体重となるように摂取すればよい。また、有効成分として本発明の化合物を使用した場合、特に限定はないが、ヒト（例えば成人）1

日当り $0.0001 \mu\text{g} \sim 2000 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、好ましくは $0.001 \mu\text{g} \sim 1000 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、より好ましくは $0.01 \mu\text{g} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。もちろん摂取量は、種々の条件、例えば抽出溶媒の種類、使用した溶媒の使用量等によっても変動するので、上記摂取量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。

また、本発明は、前記有効成分を含有してなる、骨形成促進作用または BMP 産生増強作用を有する生物用の飼料を提供するものであり、さらに、別の一態様として、前記有効成分を生物に投与することを特徴とする生物の飼育方法をも提供する。また、本発明の別の一態様として、前記有効成分を含有することを特徴とする生物飼育用剤が提供される。ここで、「含有」とは、前記の含有、添加および／または希釈を意味する。

これらの発明において、生物とはたとえば養殖動物、ペット動物などであり、養殖動物としては家畜、実験動物、家禽、魚類、甲殻類または貝類が例示される。飼料としては体調の維持および／または改善用飼料が例示される。生物飼育用剤としては浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤が例示される。

これらの発明によれば、それらを適用する前記例示するような生物において、本発明に使用される前記有効成分の骨形成促進作用または BMP 産生増強作用に基づき、本発明の前記治療剤または予防剤によるのと同様の効果の発現が期待できる。すなわち、当該生物における骨形成促進または BMP 産生増強を要する疾患の治療または予防効果が発揮され得る。

本発明に使用される前記有効成分は通常、例えば本発明で原料として使用される植物の乾燥物 1g から、抽出溶媒として 20ml の水を用いた抽出操作で得られる抽出物を 5ml に濃縮したものを有効成分とした場合、対象生物 1 日当たり $0.0001 \text{mg} \sim 2000 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、好ましくは $0.001 \text{mg} \sim 1000 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、より好ましくは $0.01 \text{mg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 体重投与される。また、有効成分として本発明の化合物を使用する場合、特に限定はない

が、対象生物1日当たり $0.0001\mu\text{g}\sim 2000\text{mg}/\text{kg}$ 体重、好ましくは $0.001\mu\text{g}\sim 1000\text{mg}/\text{kg}$ 体重、より好ましくは $0.01\mu\text{g}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 体重である。もちろん投与量は、種々の条件、例えば抽出溶媒の種類、使用した溶媒の使用量等によっても変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。投与は、たとえば、当該有効成分を、対象生物に供する人工配合飼料の原料中に添加、混合しておくか、人工配合飼料の粉末原料と混合した後、その他の原料にさらに添加、混合することで行うことができる。また、前記有効成分の飼料中の含有量は特に限定されるものではなく、目的に応じて適宜設定すれば良いが、例えば本発明で原料として使用される植物の乾燥物1gから、抽出溶媒として20mlの水を用いた抽出操作で得られる抽出物を5mlに濃縮したものを有効成分とした場合、飼料100重量%中、0.1重量%以上、好ましくは1～100重量%、より好ましくは6～100重量%である。また、有効成分として本発明の化合物を使用する場合、特に限定はないが、飼料100重量%中、0.0001重量%以上、好ましくは0.001～50重量%、より好ましくは0.006～10重量%である。

本発明の飼料の製造法に特に限定はなく、また配合も一般の飼料に準ずるものであればよく、製造された飼料中に骨形成促進作用またはBMP産生増強作用を有する本発明に係る前記有効成分が含まれていればよい。

生物飼育用剤は、前記飼料の場合に準じて、製造、使用等すればよい。

本発明が適用できる生物としては限定はないが、養殖動物としては、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ラマなどの家畜、マウス、ラット、モルモット、ウサギなどの実験動物、ニワトリ、アヒル、七面鳥、駝鳥などの家禽、ペット動物としてはイヌ、ネコなどが挙げられ、広く適用できる。

骨形成促進作用またはBMP産生増強作用を有する本発明に使用される前記有効成分を含んでなる飼料を摂取させること、または骨形成促進作用またはBMP

産生増強作用を有する本発明に使用される前記有効成分の含有液に対象生物を浸漬することにより、家畜、実験動物、家禽、ペット動物などの体調を良好に維持し、または、改善させたりすることができる。なお、これらの態様は、本発明により提供される生物の飼育方法の一態様をなす。

続いて、本発明のBMP産生増強作用の測定方法、BMP産生増強作用を有する物質のスクリーニング方法および該物質の製造方法について説明する。これらの方法はいずれも、本発明において原料として使用する植物の選別や本発明の有効成分の取得、本発明の有効成分および該有効成分を含む、治療剤、食品等の組成物が有するBMP産生増強作用を評価するのに好適に使用される。

本発明の別の態様として、被験物質のBMP産生増強作用の測定方法であって、(a) 被験物質と接触させた条件下で、HuO9細胞もしくはその亜株、またはこれらのうちいずれか1種の細胞株を用いて得られたハイブリドーマ（以下、それらの細胞をまとめて本発明の細胞株と称することがある）を培養する工程、および(b) 工程(a)で得られた培養液中のBMP量を被験物質のBMP産生増強作用の指標として測定する工程、を包含することを特徴とするBMP産生増強作用の測定方法（本発明の測定方法と称することがある）が提供される。

本発明の測定方法は、種々のBMP産生細胞の中でも本発明の細胞株を用いることで初めて細胞のBMP産生量を安定的に測定できることを明らかにし、完成されたものである。なお、後述する、本発明のBMP産生増強作用を有する物質のスクリーニング方法および該物質の製造方法についても同様である。

前記HuO9細胞（ヒト骨肉腫細胞）は市販されており、入手可能である。また、HuO9細胞の亜株としては、自然変異株、人工変異株等の変異株が例示される。前記人工変異株は、例えば変異誘起剤や紫外線照射といった公知の変異処理により作製することができる。さらにこれらのうちいずれか1種の細胞株を用いて得られたハイブリドーマとしては、公知の細胞融合操作により作製することができ、例えばミエローマ細胞との細胞融合等の方法により得られた細胞株が例

示される。

本発明の測定方法において、本発明に使用される細胞株の培養に使用される培地には、特に限定はなく、当該細胞が生育可能な培地を選択すれば良く、公知である市販の培地を使用しても良い。本発明に使用される細胞株の培養時間としては、被験物質による作用によって細胞のBMP産生量が上昇するに要する時間以上であれば特に限定はないが、例えば数分間～10日間、好ましくは1時間～5日間、より好ましくは12時間～3日間が挙げられる。培養温度についても、特に限定はなく、本発明に使用される細胞株の生育に適した温度、例えば0～100℃、好ましくは10～60℃、より好ましくは20～50℃で培養を行うことができる。

工程（a）における、被験物質と接触させた条件下での本発明の細胞株の培養は、例えば、本発明の細胞株の培養開始と共に、または培養中に、該細胞株を含む培養液に対し被験物質を添加、混合し、培養を開始または継続することにより行うことができる。被験物質の添加量は、特に限定するものではなく、所望の効果が得られるように適宜設定すればよい。被験物質を添加する際の培養液中の本発明の細胞株の量としては $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/ml程度であるのが好ましい。

一定時間培養後、工程（b）において、本発明の細胞株から産生されたBMP量を測定する。培養液中のBMP量の測定は、特に限定はないが、例えばエンザイムイムノアッセイ法、ラジオイムノアッセイ法、ウエスタンブロッティング法、またはBMPの生物学的な作用、例えば骨芽細胞への分化誘導能を指標としたバイオアッセイにより行うことができる（例えば、Katagiri et al., BBRC Vol. 172, No. 1, p295-299 (1990); Yamaguchi et al., BBRC Vol. 120, No. 2, p366-371 (1996); Takuwa et al., BBRC Vol. 174, No. 1, p96-101 (1991)参照）。

本発明の測定方法においては、BMP産生増強作用を本発明の細胞株から産生されたBMP量を指標として測定する。例えば、後述の実施例4のごとく、被験

物質と接触させていない場合に本発明の細胞株より産生されるBMP量を100%として、被験物質と接触させた場合のBMP量を相対的に表すことにより、被験物質のBMP産生増強作用を定量的に測定（評価）することができる。すなわち、BMP量が100%を超える場合、被験物質はBMP産生増強作用を有すると判定でき、またBMP量は相対量として数値で表されることから、その作用を定量的に評価することができる。

さらに本発明の別の態様として、（a）被験物質と接触させた条件下で本発明の細胞株を培養する工程、および（b）工程（a）で得られた培養液中のBMP量を測定する工程、ここで、被験物質と接触させない条件下またはBMP産生増強作用を有する対照物質と接触させた条件下で前記細胞株を培養した時と比べて、BMP量が多い場合、被験物質がBMP産生増強作用を有すると判定する、を包含することを特徴とするBMP産生増強作用を有する物質のスクリーニング方法（以下、本発明のスクリーニング方法と称することがある）が提供される。

本発明のスクリーニング方法は、前記の本発明の測定方法と同様にして実施することができる。

例えば、前記のごとく、被験物質と接触させていない場合の本発明の細胞株より産生されるBMP量を100%として、被験物質と接触させた場合のBMP量を相対的に表すことにより、被験物質のBMP産生増強作用を定量的に表し、BMP量が100%を超える場合、被験物質はBMP産生増強作用を有すると判定する。また、例えば、被験物質および一定のBMP産生増強作用を有する対照物質（例えば、前記式（A）で表される化合物）のそれぞれによるBMP産生増強作用を測定し、対照物質の場合のBMP量を100%として被験物質のBMP量を前記の場合に準じて定量的に表し、両者を比較することで、より優れたBMP産生増強作用を有する物質をスクリーニングすることができる。ここでBMP産生増強作用の測定には、上記した本発明の測定方法を使用することができる。

さらに本発明の別の態様として、（a）BMP産生増強作用を有する物質を得

る工程、および（b）本発明の測定方法を用いて、工程（a）で得られた物質のBMP産生増強作用を測定する工程を包含することを特徴とするBMP産生増強作用を有する物質の製造方法（以下、本発明の製造方法1と称することがある）が提供される。本発明の製造方法1は、BMP産生増強作用が検定されたBMP産生増強物質の製造において有用である。

工程（a）は、例えば、前記の本発明のスクリーニング方法に従ってBMP産生増強物質を取得することにより行うことができる。

工程（b）では、例えば、得られたBMP産生増強物質からBMP産生増強成分を単離精製することができる。すなわち、工程（b）において本発明の測定方法を用いて、工程（a）で得られた物質のBMP産生増強作用を測定することにより、該作用を指標としてBMP産生増強成分の精製の程度を確認しながら単離精製操作を行うことで、所望の成分を取得することができる。BMP産生増強成分の単離精製は、本発明の有効成分である植物由来処理物に適用され得る方法として前記したような公知の方法に従って行えばよい。

また、本発明の製造方法の一態様として、（a）被験物質と接触させた条件下で本発明の細胞株を培養する工程、および（b）工程（a）で得られた培養液中のBMP量を測定する工程、ここで、被験物質と接触させない条件下またはBMP産生増強作用を有する対照物質と接触させた条件下で前記細胞株を培養した時と比べて、BMP量が多い場合、被験物質がBMP産生増強作用を有すると判定し、該被験物質をBMP産生増強作用を有する物質として取得する、を包含することを特徴とするBMP産生増強作用を有する物質の製造方法（以下、本発明の製造方法2という）が提供される。

かかる本発明の製造方法2は、前記の本発明のスクリーニング方法と同様に実施することができる。本発明の製造方法2においては、被験物質がBMP産生増強作用を有すると判定された場合、該被験物質をBMP産生増強作用を有する物質として取得する。得られたBMP産生増強作用を有する物質を、さらに本

発明の製造方法 1 に供し、BMP 産生増強成分の単離精製を行ってもよい。

本発明で使用する前記有効成分は、その作用発現にとっての有効量の投与を生物に対し行っても毒性は認められない。たとえば経口投与の場合、アシタバ、セロリ、ユリ、アロエもしくはヨモギの水抽出物を 1 g / k g 体重でマウスに単回投与しても死亡例は認められない。また、前記有効成分は、ラットに対し 1 g / k g 体重を経口単回投与しても死亡例は認められない。

実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの記載に何ら限定されるものではない。なお、特段の事情がない限り、実施例における % は容量 % を意味する。

実施例 1 (E)-1-(5, 6, 7, 8, 8a, 10a-hexahydro-1, 7-dihydroxy-8, 8, 10a-trimethyl-9H-xanthen-4-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-propen-1-one の調製

(1) アシタバ (*Angelica keiskei* Koidz.) 根部の乾燥粉末 5.8 k g に 24 l の酢酸エチルを加え、室温で攪拌下、3 時間抽出を行い、吸引ろ過後、酢酸エチル抽出液と残渣に分けた。酢酸エチル抽出液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮後、クロロホルムに溶解し、全量をシリカゲル BW-300SP (富士シリシア化学社製: 750 ml) に吸着させた。次いで、ヘキサン: クロロホルム = 2 : 5 (750 ml)、クロロホルム (1000 ml)、クロロホルム: メタノール = 10 : 1 (1100 ml) を順に用いて吸着物を段階的に溶出した。

(2) 実施例 1 - (1) で得られたクロロホルム: メタノール = 10 : 1 溶出画分を濃縮乾固後、クロロホルム 30 ml に溶解し、うち半容をシリカゲル (BW-300SP、300 ml) に吸着させた。次いで、クロロホルム (1800 ml)、クロロホルム: メタノール = 500 : 7 (300 ml)、酢酸エチル (300 ml) を順に用いて吸着物を段階的に溶出した。

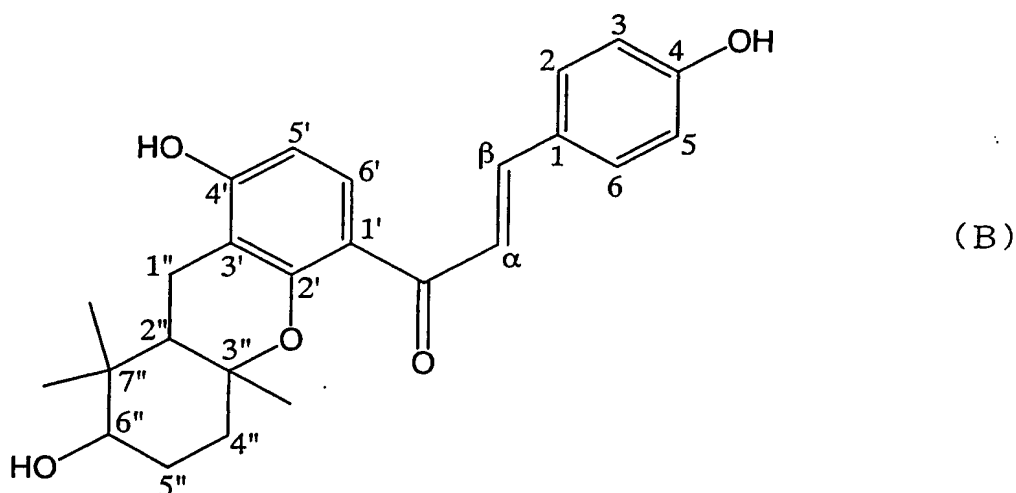
(3) 実施例 1 - (2) で得られた酢酸エチル溶出画分を濃縮乾固後、クロロホルム：メタノール=50：1 (20 ml) に溶解し、シリカゲル (BW-300 SP、300 ml) に吸着させた。続いて、クロロホルム：メタノール=500：10 (1200 ml)、クロロホルム：メタノール=500：13 (500 ml)、クロロホルム：メタノール=500：19 (500 ml)、クロロホルム：メタノール=500：22 (800 ml)、酢酸エチル (500 ml) を順に用いて段階的に溶出し、1 フラクションに 18 ml ずつ分取した。

(4) 実施例 1 - (3) で得られたシリカクロマトフラクションの番号 115 から 155 を集めて減圧濃縮し、7 ml のジメチルスルホキシドに溶解した。うち半容を逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。樹脂はコスモシール 140 C18-OPN (ナカライテスク社製：樹脂量 50 ml) を用いた。続いて、蒸留水 (40 ml)、20% エタノール水溶液 (50 ml)、30% エタノール水溶液 (50 ml)、50% エタノール水溶液 (1 回目溶出 50 ml、その後 2 回目溶出 50 ml)、エタノール (50 ml) を順に用いて溶出を行った。

(5) 実施例 1 - (4) の 50% エタノール水溶液溶出画分のうち 1 回目溶出部分 50 ml を減圧濃縮した後、3 ml の 50% エタノール水溶液に溶解し、逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。以下にその条件について述べる。カラムは TSK gel ODS-80Ts (21.5 mm×30 cm：東ソー社製) を用いた。溶媒として蒸留水とアセトニトリルを容量比 1 対 1 で混合したものを用い、溶出速度は 5 ml/min、検出は 215 nm で行なった。溶出液の紫外線吸収を指標に逆相クロマトフラクション 1~5 を採取した。

(6) 実施例 1 - (5) で得た逆相クロマトフラクション 2 (保持時間 24.1 分の検出のピークを含むフラクション) の質量スペクトル (MS) を質量分析計 (DX302：日本電子社製) により FAB-MS の手法で測定した。マトリックスには m-ニトロベンジルアルコールを用いた。その結果、 m/z 407 (M-H)⁻ のピークを検出した。第 1 図に質量スペクトルを示す。第 1 図にお

いて、横軸は m/z 値、縦軸は相対強度を示す。次いで、逆相クロマトフラクション2を核磁気共鳴（NMR）スペクトル装置（A V A N C E 6 0 0 型：ブルカ・バイオスピン社製）を用い、各種NMRスペクトルを測定し構造解析した。以下にNMRの帰属の信号を示す。なお、ピークの帰属の番号は以下の式（B）のとおりである。



$^1\text{H-NMR}$: δ 0. 81 (3H, s, 7''-CH₃), 1. 03 (3H, s, 7''-CH₃), 1. 25 (3H, s, 3''-CH₃), 1. 54 (1H, m, 5''-H), 1. 61 (1H, dd, $J=4.8, 13.2$ Hz, 2''-H), 1. 71 (1H, m, 5''-H), 1. 75 (1H, m, 4''-H), 1. 87 (1H, m, 4''-H), 2. 34 (1H, dd, $J=13.2, 16.8$ Hz, 1''-H), 2. 67 (1H, dd, $J=4.8, 16.8$ Hz, 1''-H), 3. 27 (1H, m, 6''-H), 4. 65 (1H, d, $J=4.8$ Hz, 6''-OH), 6. 47 (1H, d, $J=8.4$ Hz, 5'-H), 6. 83 (2H, d, $J=8.4$ Hz, 3-Hおよび5-H), 7. 39 (1H, d, $J=8.4$ Hz, 6'-H), 7. 42 (1H, d, $J=15.6$ Hz, β -H), 7. 48 (1H, d, $J=15.6$ Hz, α -H), 7. 51 (2H, d, $J=8.4$ Hz, 2-Hおよび6-H), 9. 97 (1H, br-s, 4-OH), 10. 22 (1H, br-s, 4'-OH)

但し、 $^1\text{H-NMR}$ においてサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシド中の残留プロトンの化学シフト値を2. 51ppmとして表した。第2図に $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。第2図において横軸は化学シフト値、縦軸はシグ

ナルの強度を示す。

^{13}C -NMR : δ 15. 3 (7"-CH₃), 18. 8 (1"-C), 20. 7 (3"-CH₃), 28. 1 (7"-CH₃), 28. 9 (5"-C), 38. 3 (4"-C), 38. 9 (7"-C), 46. 4 (2"-C), 76. 8 (6"-C), 77. 9 (3"-C), 107. 7 (5'-C), 110. 4 (3'-C), 116. 8 (3-Cおよび5-C), 120. 8 (1'-C), 125. 2 (α -C), 127. 1 (1-C), 130. 2 (6'-C), 130. 8 (2-Cおよび6-C), 141. 2 (β -C), 154. 9 (2'-C), 160. 3 (4-C), 160. 6 (4'-C), 189. 8 (C=O)

但し、 ^{13}C -NMRにおいてサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの化学シフト値を40. 2ppmとして表した。第3図に ^{13}C -NMRスペクトルを示す。第3図において横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

以上、逆相クロマトフラクション2について行った質量スペクトル、NMRスペクトル解析の結果、逆相クロマトフラクション2が(E)-1-(5, 6, 7, 8, 8a, 10a-hexahydro-1, 7-dihydroxy-8, 8, 10a-trimethyl-9H-xanthen-4-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-propen-1-one (分子量408、以下化合物a) であることを確定した。

実施例2 化合物aによるST-2細胞の骨芽細胞への分化誘導作用

(1) マウス間質系細胞株ST-2を10% ウシ胎児血清(バイオウィタカ社製)を含むDMEM培地(バイオウィタカ社製)に 3×10^4 細胞/mlとなるように懸濁し、96穴プレートに0. 1mlずつまき無菌的に培養した。2日間培養後、新しい培地に置き換えた。これに試料として実施例1で得られたアシタバ根由来化合物aを添加し、3日間培養した。続いて、ST-2細胞の骨芽細胞への分化をアルカリ性フォスファターゼを指標として測定した。細胞をPBSで一回洗浄し、反応基質液(100mM ジエタノールアミン緩衝液 pH10. 0、2mM 塩化マグネシウム、1mM p-ニトロフェニルリン酸) 100 μ lを加え、37℃で30分間反応を行った。次に、0. 2Nの水酸化ナトリウム100 μ lを加えて反応を停止し、遊離したp-ニトロフェノール量を吸光度

405 nmで測定した。対照は試料無添加とし、対照のアルカリ性フォスファターゼ活性を100%として、骨芽細胞への分化誘導活性を表した。試料の添加量は表1に示す通りとした。実験は2連で行い、その平均値を採用した。その結果、化合物aが濃度依存的に骨芽細胞への分化を誘導することが明らかとなった。表1にその結果を示す。

表1 化合物aによるST-2細胞の骨芽細胞への分化誘導活性

添加量 (μ M)	アルカリ性フォスファターゼ活性 (%)
0	100
0.313	219.4
0.625	259.6
1.25	358.3

実施例3 化合物aによるMC3T3-E1細胞の骨芽細胞への分化誘導作用

マウス前骨芽細胞株MC3T3-E1を10% ウシ胎児血清を含むDMEM培地に 3×10^4 細胞/mlとなるように懸濁し、96穴プレートに0.1mlずつまき無菌的に培養した。2日間培養後、新しい培地に置き換えた。これに試料として実施例1で得られたアシタバ根由来化合物aを添加し、5日間培養した。続いて、実施例2と同様の方法で骨芽細胞への分化をアルカリ性フォスファターゼを指標として測定した。その結果、化合物aが濃度依存的に骨芽細胞への分化を誘導することが明らかとなった。表2にその結果を示す。

表2 化合物aによるMC3T3-E1細胞の骨芽細胞への分化誘導活性

添加量 (μ M)	アルカリ性フォスファターゼ活性 (%)
0	100
1.25	171.0
2.5	292.2

実施例4 アシタバのBMP-2産生増強作用

(1) アシタバ根乾燥物を粉碎したもの 2 g に対し 40 ml の水を加え、攪拌下、60℃で30分間抽出を行った。次に遠心分離を行い上清と沈殿に分けた。沈殿に対して同様の抽出操作を2回繰り返した。得られた上清を集め、10 ml まで濃縮し、アシタバ根水抽出物を調製した。

(2) ヒト骨肉腫細胞株HuO9を10% ウシ胎児血清を含むDMEM培地に 1×10^5 細胞/ml となるように懸濁し、96穴プレートに0.1 ml ずつまき無菌的に培養した。2日間培養後、新しい培地に置き換えた。これに試料として実施例4-(1)で得られたアシタバ根水抽出物を添加し、48時間培養した。次に、培養液中の骨形成タンパク質-2 (BMP-2) の濃度をエンザイムイムノアッセイ法 (BMP-2 Immuno assay: GT社製) にて測定した。対照は試料無添加とし、この細胞培養液中のBMP-2濃度(細胞のBMP-2産生量)を100%として、BMP-2産生増強活性を表した。試料の添加量は表3に示す通りとした。実験は2連で行い、その平均値を採用した。その結果、実施例4-(1)で得られたアシタバ根水抽出物が濃度依存的にBMP-2の産生を増強することが明らかとなった。表3にその結果を示す。

表3 アシタバ根水抽出物のBMP-2産生増強作用

添加量 (%)	BMP-2産生増強活性 (%)
0	100.0
0.625	192.8
1.25	277.7
2.5	405.0

ただし、対照のBMP-2産生量は0.270 ng/mlであった。

実施例5 アシタバの骨芽細胞への分化誘導作用

マウス胚細胞株C3H10T1/2を10% ウシ胎児血清を含むDMEM培地に 3×10^4 細胞/ml となるように懸濁し、96穴プレートに0.1 ml ずつまき無菌的に培養した。3日間培養後、新しい培地に置き換えた。これに試料

として実施例 4 - (1) で得られたアシタバ根水抽出物を添加し、6 日間培養した。続いて、実施例 2 と同様の方法で骨芽細胞への分化をアルカリ性フォスファターゼを指標として測定した。その結果、実施例 4 - (1) で得られたアシタバ根水抽出物が濃度依存的に骨芽細胞への分化を誘導することが明らかとなった。表 4 にその結果を示す。

表 4 アシタバ根水抽出物の骨芽細胞への分化誘導作用

添加量 (%)	アルカリ性フォスファターゼ活性 (%)
0	100.0
0.025	137.1
0.05	153.4
0.1	159.4
0.2	202.9

実施例 6 アシタバ根水抽出物由来コスモシル分画物の BMP - 2 産生増強作用

(1) アシタバ根部乾燥物を粉碎したもの 3 kg に対し 30 l の水を加え、攪拌下、60℃で 60 分間抽出を行った。次に遠心分離を行い上清と沈殿に分けた。沈殿に対して 20 l の水を加え、攪拌下、室温で 60 分間抽出を行った。次に遠心分離を行い上清と沈殿に分けた。上清を合わせアシタバ根水抽出液 45 l を調製した。

(2) 実施例 6 - (1) で得られたアシタバ根水抽出液を逆相クロマトグラフィーを用いて分画を行った。以下にその条件を示す。樹脂はコスモシル 140 C18-OPN (樹脂量 700 ml) を用いた。アシタバ根由来水抽出液 1.5 l を供し、展開溶媒として、水 (2.1 l)、10%エタノール (2 l)、20%エタノール (2.3 l)、40%エタノール (2 l)、60%エタノール (3.5 l) を順に用いて溶出を行い各コスモシル分画物を得た。

(3) 実施例 6 - (2) で得られた各コスモシル分画物の 1/50 量を 10

ml まで濃縮した。各濃縮物の BMP-2 産生増強活性を実施例 4-(2) と同様の方法で測定した。その結果、水溶出画分、10%エタノール溶出画分、20%エタノール溶出画分に BMP-2 産生増強活性があることが明らかになった。表 5 にその結果を示す。

表 5

画分	試料濃度 (%)	BMP-2 産生増強活性 (%)
	0	100
水溶出画分	1.25	438.5
	2.5	753.7
	5	1079
	10	1064
10%エタノール溶出画分	1.25	198.2
	2.5	283.5
	5	394.6
	10	637.5
20%エタノール溶出画分	1.25	180.1
	2.5	167.2
	5	244.7
	10	376.5

ただし、対照の BMP-2 産生量は 0.126 ng/ml であった。

実施例 7 アシタバ根水抽出物由来シリカカラム分画物の BMP-2 産生増強作用

(1) 実施例 6-(1) で得られたアシタバ根水抽出液のうち 411 を 191 にまで濃縮し、アシタバ根水抽出濃縮液を調製した。

(2) 実施例 7-(1) で得られたアシタバ根水抽出濃縮液 300 ml に 200 ml のエタノールを加え、室温で 1 時間静置後、遠心分離を行い上清と沈殿に分けた。沈殿に蒸留水 300 ml を加えたものに対し、同様の操作を繰り返した。得られた上清を合わせ、濃縮乾固した後、蒸留水 108 ml に溶解しアシタバ根水抽出物由来エタノール沈殿処理物を調製した。

(3) 実施例 7 - (2) で得られたアシタバ根水抽出物由来エタノール沈殿処理物をシリカクロマトグラフィーを用いて分画を行った。以下にその条件を示す。アシタバ根水抽出物由来エタノール沈殿処理物 25 ml を濃縮乾固後、クロロホルムとエタノールを容量比 6 対 3 で混合したものに溶解し、シリカゲル BW-300SP (樹脂量 300 ml) に吸着させた。次いで、クロロホルム：エタノール = 6 : 3 (600 ml)、クロロホルム：エタノール：水 = 30 : 15 : 1 (900 ml)、クロロホルム：エタノール：水 = 12 : 8 : 1 (500 ml)、エタノール：水 = 10 : 1 (600 ml)、エタノール：水 = 20 : 3 (200 ml)、エタノール：水 = 4 : 1 (250 ml)、エタノール：水 = 1 : 1 (300 ml) を順に用いて吸着物を段階的に溶出した。

クロロホルム：エタノール：水 = 12 : 8 : 1 の後半溶出部分 (200 ml) とエタノール：水 = 10 : 1 の前半溶出部分 (200 ml) を集めて、シリカカラム溶出画分 1 を得た。エタノール：水 = 10 : 1 の後半溶出部分 (400 ml) とエタノール：水 = 20 : 3 溶出部分、エタノール：水 = 4 : 1 溶出部分を集めて、シリカカラム溶出画分 2 を得た。エタノール：水 = 1 : 1 溶出部分をシリカカラム溶出画分 3 として得た。

(4) 実施例 7 - (3) で得られた各シリカカラム分画物の 1 / 5 量を 1.25 ml まで濃縮した。各濃縮物の BMP-2 産生増強活性を実施例 4 - (2) と同様の方法で測定した。その結果、表 6 に示す画分に BMP-2 産生増強活性があることが明らかになった。

表 6

画分 (溶出溶媒組成)	試料濃度 (%)	BMP-2 産生増強活性 (%)
	0	100
画分 1	0.625	152.2
(クロロホルム：エタノール：水＝12：8：1	1.25	185.1
、エタノール：水＝10：1)	2.5	307.5
画分 2	0.625	191.0
(エタノール：水＝10：1、	1.25	310.4
20：3、4：1)	2.5	492.5
	5	558.2
画分 3	0.625	244.8
(エタノール：水＝1：1)	1.25	420.9
	2.5	671.6
	5	803.0

ただし、対照の BMP-2 産生量は 0.096 ng/ml であった。

実施例 8 セロリ葉部水抽出物の BMP-2 産生増強作用

(1) セロリ葉部乾燥物を粉碎したもの 2 g に対し 40 ml の水を加え、攪拌下、60℃で30分間抽出を行った。次に遠心分離を行い上清と沈殿に分けた。沈殿に対して同様の抽出操作を2回繰り返した。得られた上清を合わせ、10 ml まで濃縮し、セロリ葉部水抽出物を調製した。

(2) 実施例 8-(1) で調製したセロリ葉部水抽出物の BMP-2 産生増強活性を実施例 4-(2) と同様の方法で測定した。その結果、セロリ葉部水抽出物に BMP-2 産生増強活性があることが明らかになった。

表 7 セロリ葉部水抽出物の BMP-2 産生増強作用

添加量 (%)	BMP-2 産生増強活性 (%)
0	100
2.5	171.8
5.0	527.0

ただし、対照の BMP-2 産生量は 0.119 ng/ml であった。

実施例 9 アロエ水抽出物の BMP-2 産生増強作用

(1) アロエ乾燥物を粉碎したもの 2 g に対し 40 ml の水を加え、攪拌下、60℃で30分間抽出を行った。次に遠心分離を行い上清と沈殿に分けた。沈殿に対して同様の抽出操作を2回繰り返した。得られた上清を合わせ、10 ml まで濃縮し、アロエ水抽出物を調製した。

(2) 実施例 9 - (1) で調製したアロエ水抽出物の BMP-2 産生増強活性を実施例 4 - (2) と同様の方法で測定した。その結果、アロエ水抽出物に BMP-2 産生増強活性があることが明らかになった。

表 8 アロエ水抽出物の BMP-2 産生増強作用

添加量 (%)	BMP-2 産生増強活性 (%)
0	100
5.0	238.5

ただし、対照の BMP-2 産生量は 0.274 ng/ml であった。

実施例 10 ヨモギ水抽出物の BMP-2 産生増強作用

(1) ヨモギ乾燥物を粉碎したもの 2 g に対し 40 ml の水を加え、攪拌下、60℃で30分間抽出を行った。次に遠心分離を行い上清と沈殿に分けた。沈殿に対して同様の抽出操作を2回繰り返した。得られた上清を合わせ、10 ml まで濃縮し、ヨモギ水抽出物を調製した。

(2) 実施例 10 - (1) で調製したヨモギ水抽出物の BMP-2 産生増強活性を実施例 4 - (2) と同様の方法で測定した。その結果、ヨモギ水抽出物に BMP-2 産生増強活性があることが明らかになった。

表 9 ヨモギ水抽出物のBMP-2産生増強作用

添加量 (%)	BMP-2産生増強活性 (%)
0	100
0.25	383.4
0.5	461.5

ただし、対照のBMP-2産生量は0.119 ng/mlであった。

実施例 11 アロエ水抽出物の骨芽細胞への分化誘導作用

実施例 9 - (1) で調製したアロエ水抽出物の骨芽細胞への分化誘導作用を実施例 5 と同様の方法で測定した。その結果、実施例 9 - (1) で得られたアロエ水抽出物が濃度依存的に骨芽細胞への分化を誘導することが分かった。表 10 にその結果を示す。

表 10 アロエ水抽出物の骨芽細胞への分化誘導作用

添加量 (%)	アルカリ性フォスファターゼ活性 (%)
0	100
0.125	118.3
0.25	125.4
0.5	131.7
1	184.6
2	249.6

実施例 12 ユリ花水抽出物の骨芽細胞への分化誘導作用

(1) ユリ花部乾燥物を粉碎したもの 2 g に対し 40 ml の水を加え、攪拌下、60℃で30分間抽出を行った。次に、遠心分離を行い上清と沈殿に分けた。沈殿に対して同様の抽出操作を2回繰り返した。得られた上清を合わせ、10 ml まで濃縮し、ユリ花水抽出物を調製した。

(2) 実施例 12 - (1) で調製したユリ花水抽出物の骨芽細胞への分化誘導作用を実施例 5 と同様の方法で測定した。その結果、実施例 12 - (1) で得ら

れたユリ花水抽出物が濃度依存的に骨芽細胞への分化を誘導することが分かった。表 1 1 にその結果を示す。

表 1 1 ユリ花水抽出物の骨芽細胞への分化誘導作用

添加量 (%)	アルカリ性フォスファターゼ活性 (%)
0	1 0 0
0. 0 1 3	9 7. 9
0. 0 2 5	1 3 7. 5
0. 0 5	1 7 5. 7
0. 1	2 8 0. 8
0. 2	2 9 0. 4

実施例 1 3 アシタバ根水抽出物と組み換えヒト BMP - 2 の骨芽細胞への分化誘導作用の相乗効果

マウス胚細胞株 C 3 H 1 0 T 1 / 2 を 1 0 % ウシ胎児血清を含む D M E M 培地に 3×10^4 細胞 / m l となるように懸濁し、9 6 穴プレートに 0. 1 m l ずつまき無菌的に培養した。4 日間培養後、新しい培地に置き換えた。これに試料として実施例 4 - (1) で得られたアシタバ根水抽出物ならびに組み換えヒト BMP - 2 (G T 社製) を添加し、1 1 日間培養した。続いて、実施例 5 と同様の方法で骨芽細胞への分化をアルカリ性フォスファターゼ活性を指標として測定した。その結果、組み換えヒト BMP - 2 は濃度依存的に骨芽細胞への分化を誘導したが、アシタバ根水抽出物を併用することで骨芽細胞への分化誘導作用が増強されることが明らかとなった。表 1 2 にその結果を示す。

表 1 2 アシタバ根水抽出物とヒト BMP-2 の骨芽細胞への分化誘導作用

組み換えヒト BMP-2 (ng/ml)	アシタバ根水抽出物 (%)	アルカリ性フォスファターゼ活性 (%)
0	0	100.0
0	0.05	190.5
500	0	379.6
500	0.05	745.6
1000	0	687.1
1000	0.05	1404.1

実施例 1 4 アシタバ根水抽出物による間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導作用

ヒト間葉系幹細胞（タカラバイオ社製）を 10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地（タカラバイオ社製）に 1.2×10^4 細胞/ml となるように懸濁し、48 穴プレートに 0.5 ml ずつまき無菌的に培養した。5 日間培養後、5 mM β -グリセロリン酸、100 nM デキサメタゾンを含む新しい培地に置き換えた。これに試料として実施例 4-（1）で得られたアシタバ根水抽出物を添加し培養を行った。培地は 3、4 日ごとに交換した。ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化はアルカリ性フォスファターゼ活性および細胞へのカルシウムの蓄積を指標とした。アルカリ性フォスファターゼ活性は実施例 2 と同様の方法で測定し、1 穴あたりの 1 分間に遊離される p-ニトロフェノール量として表した。細胞に蓄積されたカルシウム量は PBS 洗浄した細胞に 6 N 塩酸を加え、超音波破碎を行った溶液について、カルシウム定量キット（カルシウム E-テストワコー；和光純薬工業社製）を用いて測定した。

その結果、アシタバ根水抽出物はヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化に伴うアルカリ性フォスファターゼ活性ならびに骨芽細胞の成熟に伴うカルシウムの蓄積を経時的に強く促進した。表 1 3 にアルカリ性フォスファターゼ活性を、表 1 4 に細胞へのカルシウム蓄積の測定結果を示す。

表 1 3

アシタバ根水抽出物 (%)	細胞のアルカリ性フォスファターゼ活性 (p m o l p-ニトロフェノール/分/穴)			
	培養時間 (日)			
	0	7	1 4	2 1
0	5 0 . 5	7 8 6 . 5	2 4 9 0 . 2	3 6 5 6 . 0
0 . 1	5 0 . 5	2 2 7 7 . 7	5 0 2 2 . 9	4 7 2 4 . 1

表 1 4

アシタバ根水抽出物 (%)	細胞へのカルシウムの蓄積 (μ g カルシウム/穴)			
	培養時間 (日)			
	0	1 4	2 1	2 8
0	0 . 9 1 0	2 . 1 4 0	2 . 2 8 8	3 . 1 9 2
0 . 1	0 . 9 1 0	2 . 5 7 5	4 . 8 3 2	5 8 . 1 2 7

産業上の利用可能性

本発明により、セリ科、ユリ科又はキク科植物由来処理物を含有する骨形成促進またはBMP産生増強を要する疾患の治療用又は予防用の医薬、骨形成促進剤、BMP産生増強剤、食品、飲料又は飼料が提供される。該医薬は骨粗鬆症や骨折等の骨に関連する疾患の治療剤又は予防剤として有用である。また、骨形成促進剤およびBMP産生増強剤は、骨折治療や歯の治療に使用されるインプラントやハミガキとして使用することができる。また、当該剤は骨の機能研究、BMP産生増強剤のスクリーニングにも有用である。また、該食品又は飲料は、日常の飲食品として摂取することにより、骨形成促進またはBMP産生増強を要する疾患の症状改善等が可能となる。また、該飼料も動物に摂取させることで同様の効果が期待できる。

請求の範囲

1. 下記（a）～（c）から選択される植物由来処理物を有効成分として含有することを特徴とする骨形成促進または骨形成タンパク質産生増強を要する疾患の治療剤又は予防剤。

（a）セリ科植物由来処理物

（b）ユリ科植物由来処理物

（c）キク科植物由来処理物

2. 植物がアシタバ、セロリ、ユリ、アロエ又はヨモギである請求項1記載の治療剤又は予防剤。

3. 下記（a）～（c）から選択される植物由来処理物を有効成分として含有することを特徴とする骨形成促進剤または骨形成タンパク質産生増強剤。

（a）セリ科植物由来処理物

（b）ユリ科植物由来処理物

（c）キク科植物由来処理物

4. 植物がアシタバ、セロリ、ユリ、アロエ又はヨモギである請求項3記載の骨形成促進剤または骨形成タンパク質産生増強剤。

5. 下記（a）～（c）から選択される植物由来処理物を含有することを特徴とする骨形成促進用または骨形成タンパク質産生増強用の食品、飲料又は飼料。

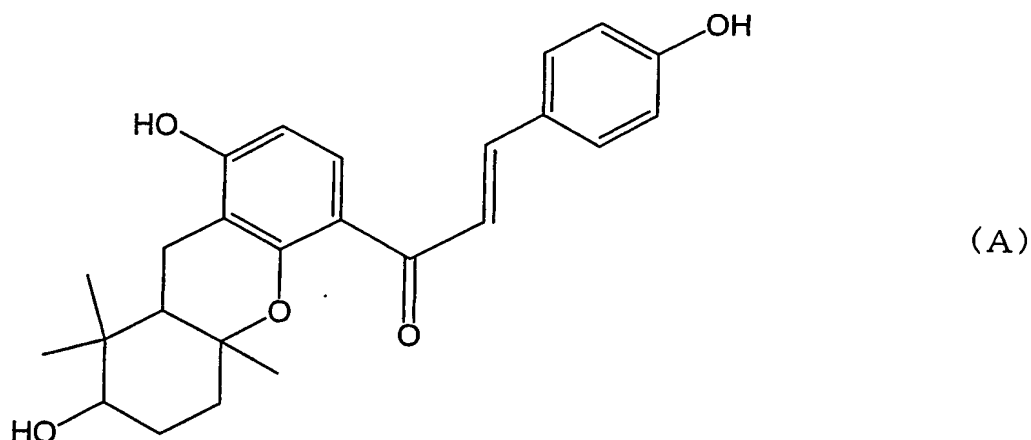
（a）セリ科植物由来処理物

（b）ユリ科植物由来処理物

（c）キク科植物由来処理物

6. 植物がアシタバ、セロリ、ユリ、アロエ又はヨモギである請求項5記載の食品、飲料又は飼料。

7. 以下の式(A)で表される化合物、その誘導体又はそれらの塩を有効成分として含有することを特徴とする骨形成促進または骨形成タンパク質産生増強を要する疾患の治療剤又は予防剤。



8. 請求項7に記載の式(A)で表される化合物、その誘導体又はそれらの塩を有効成分として含有することを特徴とする骨形成促進剤または骨形成タンパク質産生増強剤。

9. 請求項7に記載の式(A)で表される化合物、その誘導体又はそれらの塩を含有することを特徴とする骨形成促進用または骨形成タンパク質産生増強用の食品、飲料又は飼料。

10. 下記工程を包含することを特徴とする骨形成タンパク質産生増強作用の

測定方法。

(a) 被験物質と接触させた条件下で、HuO9細胞もしくはその亜株、またはこれらのうちいずれか1種の細胞株を用いて得られたハイブリドーマを培養する工程、および

(b) 工程(a)で得られた培養液中のBMP量を被験物質のBMP産生増強作用の指標として測定する工程

11. 下記工程を包含することを特徴とする骨形成タンパク質産生増強作用を有する物質のスクリーニング方法。

(a) 被験物質と接触させた条件下で、HuO9細胞もしくはその亜株、またはこれらのうちいずれか1種の細胞株を用いて得られたハイブリドーマを培養する工程、および

(b) 工程(a)で得られた培養液中のBMP量を測定する工程、ここで、被験物質と接触させない条件下またはBMP産生増強作用を有する対照物質と接触させた条件下で前記細胞を培養した時と比べて、BMP量が多い場合、被験物質がBMP産生増強作用を有すると判定する

12. 下記工程を包含することを特徴とする骨形成タンパク質産生増強作用を有する物質の製造方法。

(a) 骨形成タンパク質産生増強作用を有する物質を得る工程、および

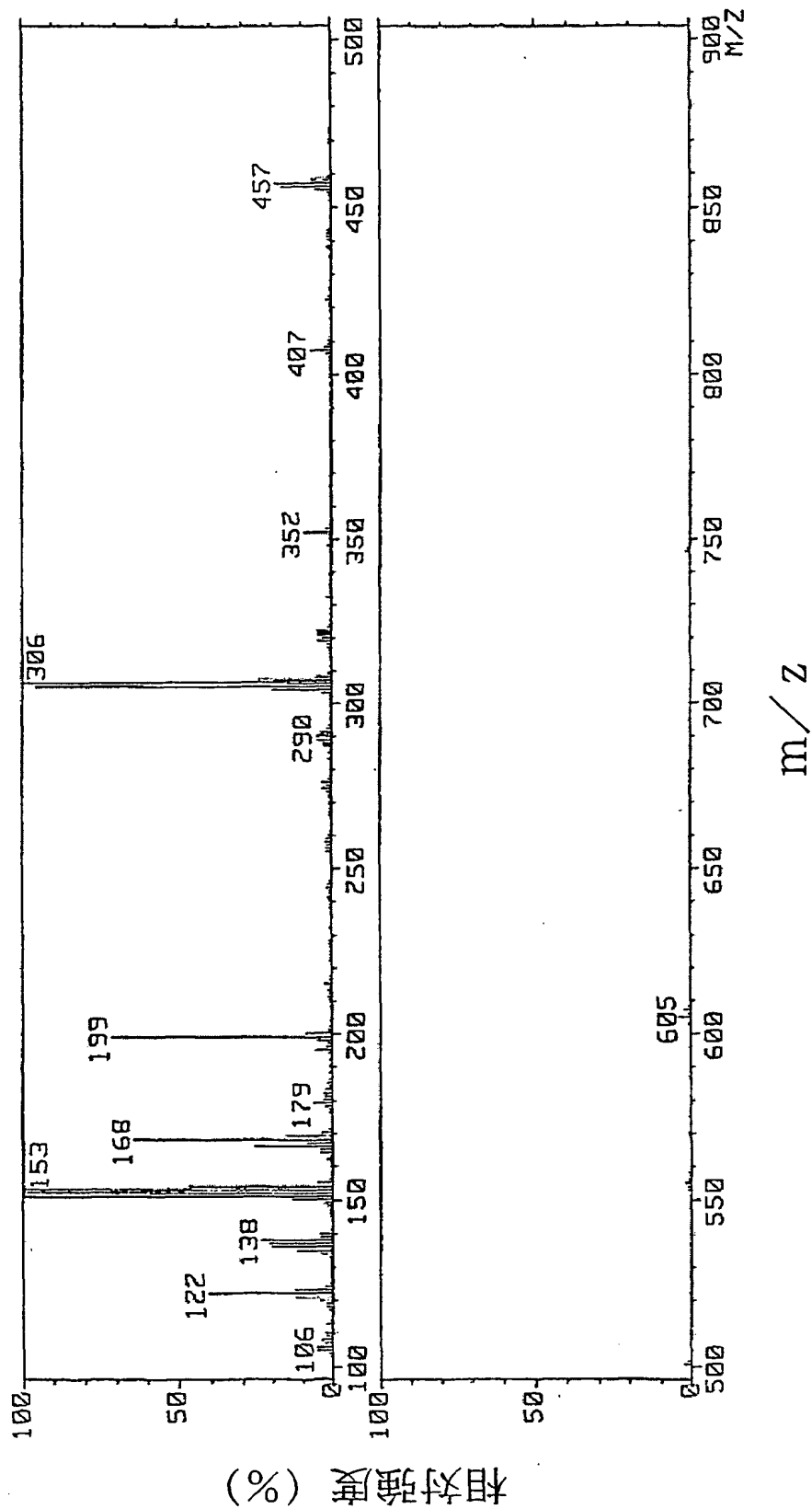
(b) 請求項10記載の測定方法を用いて、工程(a)で得られた物質の骨形成タンパク質産生増強作用を測定する工程

13. 下記工程を包含することを特徴とする骨形成タンパク質産生増強作用を有する物質の製造方法。

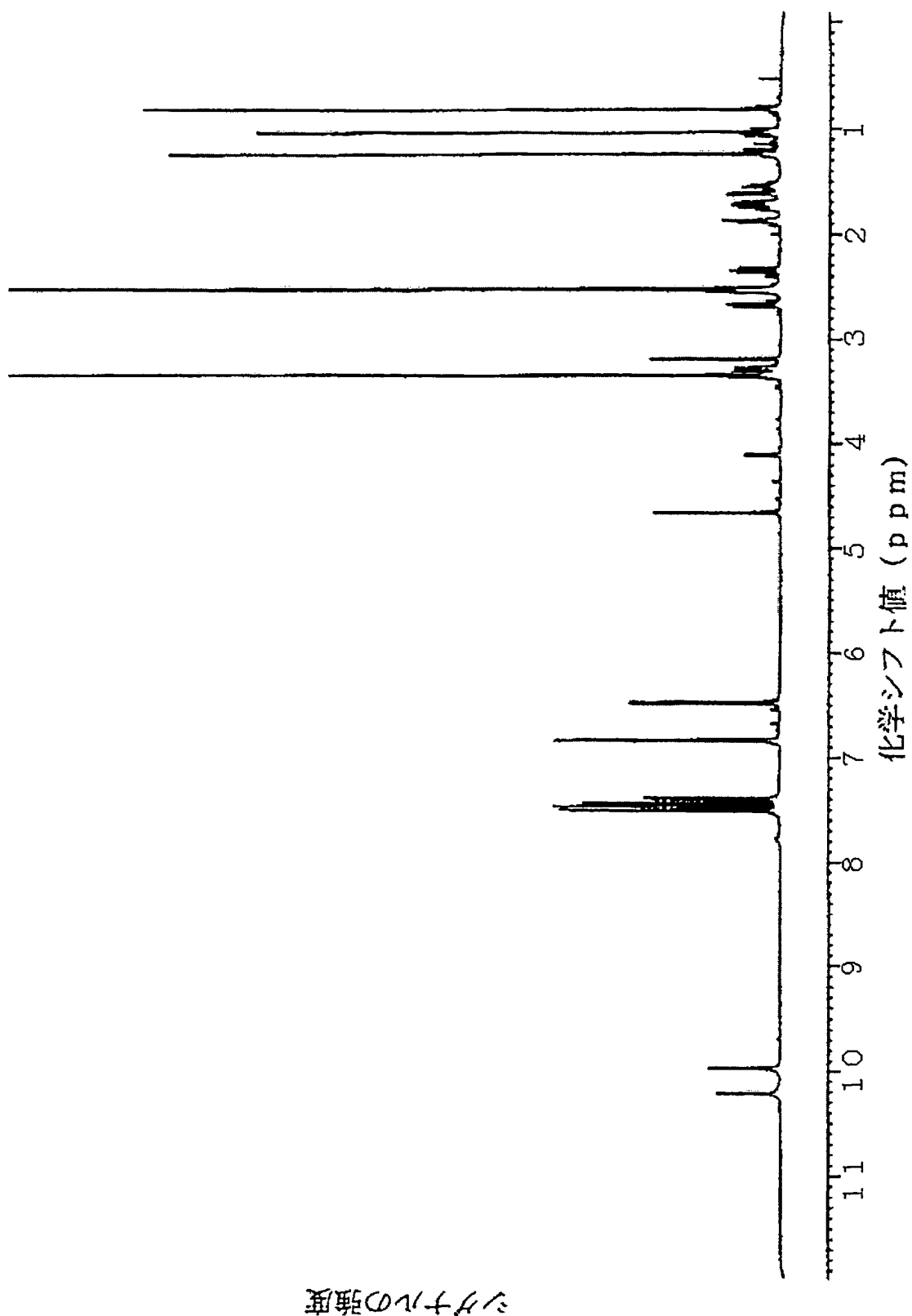
(a) 被験物質と接触させた条件下で、HuO9細胞もしくはその亜株、または

これらのうちいずれか 1 種の細胞株を用いて得られたハイブリドーマを培養する工程、および

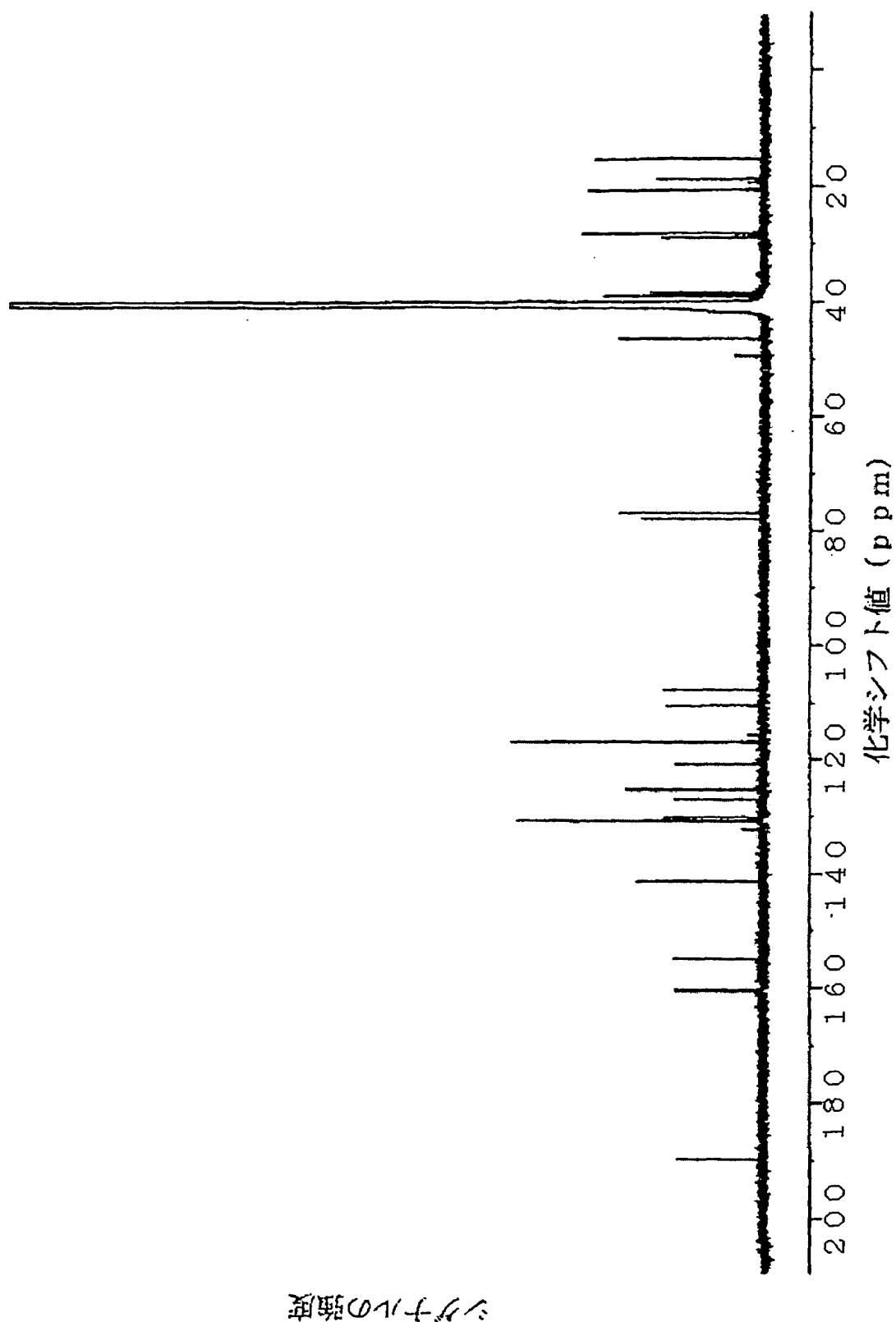
(b) 工程 (a) で得られた培養液中の BMP 量を測定する工程、ここで、被験物質と接触させない条件下または BMP 産生増強作用を有する対照物質と接触させた条件下で前記細胞を培養した時と比べて、BMP 量が多い場合、被験物質が BMP 産生増強作用を有すると判定し、該被験物質を BMP 産生増強作用を有する物質として取得する



第1図



第2図



第3図

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K35/78, 31/353, A61P19/08, 19/10, 43/00,
A23K1/16, A23L1/30, G01N33/50, 33/15 // C07D311/80

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K35/78, 31/353, A61P19/08, 19/10, 43/00,
A23K1/16, A23L1/30, G01N33/50, 33/15 // C07D311/80

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REG (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)
JICST (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	WO 03/053167 A1 (Societe Des Produits Nestle S.A.) 2003.07.0 3&EP 1325681 A1	1-6
X	JP 10-165139 A (熊本製粉株式会社) 1998.06.23 (ファミリーなし)	1-6
X	JP 11-255660 A (日本臓器株式会社) 1999.09.21 (ファミリーなし)	1-6
X	WO 98/50054 A1 (MUHLBAUER, Roman, Conrad) 1998.11.12&EP 980250 A &JP 2001-524119 A&CN 1366991 A	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.12.03

国際調査報告の発送日

20.1.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴見 秀紀



4 C 8415

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P Y	JP 2003-26572 A(株式会社林原生物科学研究所)2003. 01. 29(ファミリーなし)	7-9
Y	WO 98/58913 A1(INDENA, S. P. A)1998. 12. 30&HU 3068 A1&EP 989973 A&SK 179599 A&CN 1261349 A&US 6147082 A1&AU 742784 B&JP 2002-506439 A	7-9
Y	ORUI Hirishi et al, Effects of morphogenetic protein-2 on human tumor cell growth and differentiation:a preliminary report, J. Orthop. Sci., 2000, Vol. 5, No. 6, pp. 600-604	10-13
Y	JP 2002-51798 A(協和醗酵工業株式会社)2002. 02. 19(ファミリーなし)	10-13
A	YOSHIKAWA, H et al, Clinical significance of Bone Morphogenetic Activity in Osteosarcoma a Study of 20 cases, Cancer, 1985, Vol. 56, No. 7, pp. 1682-1687	10-13

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1～6の発明は、セリ科、ユリ科、あるいはキク科植物由来処理物を、骨形成促進または骨形成タンパク質増強産生増強を要する疾患の治療剤または予防剤に用いる発明であるのに対し、請求の範囲7～9は、上記植物由来であることに規定されない特定の化学構造を有する化合物を、上記治療剤とする発明であり、請求の範囲10～13は、特定な細胞株を被験物質と接触させて、骨形成タンパク質産生増強作用を調べることを特徴とする測定方法、スクリーニング方法、あるいは骨形成タンパク質増強産生増強を有する物質の製造方法の発明であるので、これら三つの発明群は、単一の一般的発明概念を構成するように連関している一群の発明群であるとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。